

294-83



0200

#4

PATENT

THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF MANUEL
DE JESUS ARAÑA ROSAINZ, ET AL.

SERIAL NUMBER: 09/588,525

FILED: JUNE 6, 2000

FOR: ANALOGUES OF LIPOPOLY-
SACCHARIDE-BINDING PROTEIN
(LBP)-DERIVED PEPTIDES THAT
EFFICIENTLY NEUTRALIZE
LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS)

CLAIM TO PRIORITY UNDER 35 U.S.C. § 119

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior application filed in the following foreign country is hereby requested and the right of priority provided under 35 U.S.C. § 119 is hereby claimed:

Cuban Patent Application CU 1999/71, filed June 10, 1999

In support of this claim, filed herewith is a certified copy of said original foreign application, with an English translation.

Respectfully submitted,

Ronald J. Baron
Registration Number 29,281

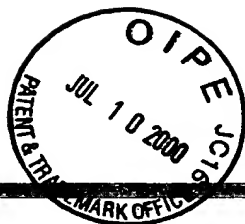
HOFFMANN & BARON, LLP
6900 Jericho Turnpike
Syosset, NY 11791

Telephone: 516-822-3550
Facsimile: 516-822-3582

DATE: July 6, 2000

I hereby certify this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail, postpaid in an envelope, addressed to:
Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C.

20231 on July 6, 2000
Dated: 07/06/00, Cassandra Jones



REPÚBLICA DE CUBA



**Lic. América N. Santos Riveras, Directora General de la
OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL.**

CERTIFICO: Que bajo el número setenta y uno del año mil novecientos noventa y nueve del Registro de Entrada, fue presentada en esta **OFICINA CUBANA DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL** la solicitud de Certificado de Autor de Invención por **ANALOGOS DE SECUENCIAS PEPTIDICAS DERIVADAS DE LA PROTEINA QUE ENLAZA LIPOPOLISACARIDO (LPS), QUE POSEEN UNA EFICIENTE CAPACIDAD DE NEUTRALIZACION DEL LPS**, con fecha diez de junio de mil novecientos noventa y nueve, a las catorce horas pasado meridiano, por Mariela Vázquez Castillo, Representante, ciudadana cubana, a nombre y en representación del **CENTRO DE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA**, cuya invención fue creada por Manuel de Jesús Araña Rosáinz; Glay Chinae Santiago; Maribel Guerra Vallespi y Osvaldo Reyes Acosta.

ASIMISMO: CERTIFICO: Que la mencionada solicitud de Certificado de Autor de Invención, se encuentra actualmente en tramitación.

TAMBIEN CERTIFICO: Que la Memoria Descriptiva, Reivindicaciones y Dibujos que se acompañan, son exactamente iguales a las que obran en el expediente.

Y a petición de Argia Poveda Marcheco, Representante, se expide la presente en la Ciudad de La Habana, República de Cuba, a los cinco días del mes de junio de dos mil.

**Lic. América N. Santos Riveras
Directora General**

MEMORIA DESCRIPTIVA

ANÁLOGOS DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS DERIVADAS DE LA PROTEÍNA QUE ENLAZA LIPOPOLISACÁRIDO (LPS), QUE POSEEN UNA EFICIENTE CAPACIDAD DE NEUTRALIZACIÓN DEL LPS.

El presente invento se refiere **en general** a análogos peptídicos de una región de la proteína que une lipopolisacárido (LBP), en los que han sido introducidas sustituciones de a.a. con respecto a la secuencia nativa, las que garantizan un efectivo enlace y neutralización de las actividades tóxicas del LPS bacteriano; y **en específico** al uso del o los péptidos, o sus derivados, para prevenir y tratar la sepsis y otras afecciones relacionadas con la endotoxina.

La respuesta inflamatoria sistémica que caracteriza a la sepsis, puede ser desencadenada por afecciones tanto infecciosas como no infecciosas, como son los traumatismos severos y la pancreatitis. Las manifestaciones de la sepsis pueden incluir las relacionadas con la respuesta sistémica a la infección, como son taquicardia, taquipnea, escalofríos, fiebre (inicialmente irregular y remitente seguida por fiebre persistente) y leucocitosis, y aquellas manifestaciones relacionadas con disfunción orgánica, como las anomalías cardiovasculares, respiratorias, renales, hepáticas y hematológicas. La sepsis se considera severa cuando está asociada a: signos de hipoperfusión (acidosis láctica, oliguria y estado mental alterado), hipotensión que lleva al shock, coagulación intravascular diseminada, síndrome de distress respiratorio del adulto o insuficiencia orgánica múltiple.

Las toxinas producidas o liberadas por diversos microorganismos son el origen de la cascada patogénica en la sepsis. Aunque el shock séptico frecuentemente se refiere sólo a infecciones por bacterias Gram-negativa, las bacterias Gram-positivas, hongos, virus, protozoos, espiroquetas, rickettsias e incluso plantas y venenos pueden producir shock séptico. La *E.coli* es el patógeno Gram-negativo más frecuentemente aislado en las sepsis, seguido por *Klebsiella-enterobacter*, y otras bacterias tales como las *Pseudomonas*, *Proteus* y *Serratia*. También la bacteriemia por *Neisseria meningitidis* es una causa frecuente de shock séptico.

El proceso en el cuadro séptico comienza con la colonización por los microorganismos de un nido de tejidos. El organismo puede entonces invadir el

torrente sanguíneo directamente (bacteremia) o proliferar localmente y liberar sustancias tóxicas hacia la sangre (toxemia). Entre estas sustancias liberadas, la endotoxina, un componente estructural de la membrana externa de las bacterias negativas se asocia comúnmente a la sepsis. En ocasiones la toxemia resulta de la translocación de endotoxinas a través de la barrera intestinal dañada.

La endotoxina es un lipopolisacárido (LPS) ubicuo de la hoja externa de la membrana exterior de todas las bacterias Gram-negativas. Las actividades biológicas y farmacológicas de los LPS son bastantes similares a pesar del microorganismo particular del cual se deriven, o de la patogenicidad de la cepa específica. Se observan diferencias estructurales en la endotoxina derivada de diferentes cepas Gram-negativas. La porción más externa de la molécula de endotoxina consiste en una serie de oligosacáridos que son estructural y antigénicamente diversos. Internamente a estos oligosacáridos, está el llamado núcleo sacarídico, el cual es estructuralmente similar en bacterias Gram-negativas. A este núcleo oligosacarídico se enlaza una parte lipídica, el lípido A, estructura muy conservada entre especies, que es responsable de la mayor parte de la toxicidad y actividades biológicas del LPS.

El LPS dispara los mecanismos humorales y de activación celular que tienen un papel patogénico en el shock y en la disfunción orgánica. Varias cascadas humorales se activan por el LPS (ó lípido A), incluyendo las del complemento, la coagulación y las kalikreinas, que son parcialmente responsables de los cambios hemodinámicos observados en la sepsis. Sin embargo, las interacciones entre el LPS y los receptores celulares de diversos tipos de células desempeñan un papel crucial en los efectos tóxicos y biológicos del LPS. Particularmente las células de linaje monocito/macrófago están involucradas en la respuesta primaria del hospedero a la endotoxina. Otros tipos de células que están implicados son los polimorfonucleares (PMN), los linfocitos y las células endoteliales. La activación de estos tipos de células por el LPS se caracteriza por la rápida producción y liberación de una serie de productos que constituyen los mediadores endógenos centrales de la sepsis, especialmente distintos tipos de citocinas tales como el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), la Interleucina-1(IL-1) y la Interleucina-6 (IL-6).

La activación intravascular de los sistemas inflamatorios involucrados en el shock séptico, así como las alteraciones hemodinámicas, son fundamentalmente consecuencia de una pérdida de regulación de la producción de estas citocinas. Entre ellas el TNF se considera como un importante mediador de los cambios fisiopatológicos asociados con la liberación del LPS. Por tanto, los enfoques que inhiben la liberación inducida por LPS de TNF resultan atractivos para reducir la morbilidad y mortalidad durante la sepsis.

El LPS interactúa con receptores celulares que están enlazados a vías de señalización que median la activación celular. El CD14, una proteína anclada a la membrana por medio de una molécula de glicerofosforilinositol (mCD14), es considerada corrientemente como el receptor celular para el LPS en células de origen mieloide¹. Otra proteína, el LBP, facilita la interacción entre el LPS y el mCD14 para formar un complejo de alta afinidad. El LBP aumenta la unión del LPS con el CD14 membranario, formando un complejo triple LBP:LPS:CD14. Informes recientes mostraron que el LBP permanece asociado con las membranas celulares de los monocitos cuando son incubados con LPS. Se ha encontrado una forma soluble de CD14 (sCD14) en suero, que también forma complejos con el LPS y activa células respondedoras al LPS que carecen de mCD14, como son las células endoteliales, las de músculo liso y las epiteliales². El LBP desempeña un papel catalítico en la formación de los complejos LPS:sCD14 para la activación de células no portadoras del mCD14. Por lo tanto el LBP desempeña una función crítica en los eventos de activación celular por LPS observados en la sepsis; moléculas que tienen la capacidad de competir, antagonizar o inhibir el efecto del LBP de incrementar las funciones tóxicas del LPS, pudieran contribuir a mejorar los síntomas de la sepsis.

En la última década se han sido descritos diversos agentes con capacidad de antagonizar los efectos del LPS y algunos de ellos se encuentran en desarrollo preclínico y/o clínico. Algunos autores han reportado una reducción de la mortalidad inducida por la administración de endotoxinas, en animales de experimentación previamente tratados con anticuerpos anti-LPS³. A partir de la demostración de que el segmento amino-terminal de la proteína bactericida e incrementadora de la permeabilidad (BPI, "bactericidal/ permeability increasing protein") mantiene todas

las propiedades antiendotóxicas y bactericidas de la holoproteína⁴, este segmento se ha empleado en estudios preclínicos y recientemente se han iniciado estudios clínicos para su introducción en la terapéutica de entidades asociadas al LPS como la meningococcemia, el trauma hemorrágico y las infecciones intra-abdominales severas.

Fragmentos peptídicos de la proteína BPI y análogos de los mismos han sido evaluados como antagonistas de endotoxina⁵⁻⁸. Entre otros agentes peptídicos que unen y neutralizan LPS se encuentran los derivados del denominado Factor anti-LPS de *Limulus* (LALF, *Limulus* anti-LPS Factor)⁹ y péptidos sintéticos antiendotoxina que mimetizan las estructuras primaria y secundaria del polimixina B.

El segmento N-terminal de la proteína LBP¹⁰, así como fragmentos peptídicos menores, que incluyen las regiones 17-45, 65-108 y 142-169 o parte de ellas^{6,11-14}, se han descrito como regiones de unión a LPS y se ha demostrado su capacidad de neutralizar los efectos tóxicos mediados por endotoxina.

Descripción detallada de la invención

La presente invención trata de la definición de secuencias peptídicas derivadas de una región de la proteína LBP, resultantes de sustituciones en la estructura primaria de la proteína nativa, las que tienen la capacidad de enlazarse y neutralizar de modo eficaz aquellos efectos biológicos del LPS asociados a sus propiedades tóxicas. Las mencionadas sustituciones le confieren a las secuencias peptídicas descritas en la presente invención propiedades ventajosas sobre secuencias sobrepuestas descritas previamente^{6,10-14}.

Para comprender las bases moleculares de la interacción LPS-proteína, se analizó la secuencia de aminoácidos del LBP y la proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad (BPI), proteínas que se conoce que enlazan al LPS específicamente. El objetivo del estudio era detectar características en la estructura primaria de estas proteínas que pudieran ser correlacionadas con la capacidad de interactuar con el LPS: El análisis incluyó la predicción de estructura secundaria y accesibilidad, la búsqueda de similitud de secuencia, la inspección de residuos conservados y el análisis de la distribución de los residuos cargados a lo largo de la secuencia. El estudio reveló la presencia de algunas regiones en la secuencia aminoacídica de las proteínas LBP y BPI, ricas en residuos básicos y por tanto potencialmente capaces

de interactuar favorablemente con los grupos ácidos del altamente aniónico LPS (lípid A). El carácter básico de algunos de estos segmentos fue específico de las proteínas LBP y BPI y no de las proteínas relacionadas PLTP (proteína transportadora de fosfolípidos) y la CEBP (proteína unidora de ésteres de colesterol) las que unen específicamente fosfolípidos y colesterol, respectivamente. Como resultado del estudio, se sugirió un sitio de unión al LPS en el LBP, localizado entre los residuos 89 y 96 de la proteína madura, considerando la presencia en esta región de un agrupamiento principal de residuos básicos¹⁴. Otros autores también han propuesto esta región o parte de la misma como posible sitio de unión a LPS en LBP^{6,11-13,15}.

Para corroborar estos hallazgos, se diseñaron, sintetizaron y probaron péptidos sintéticos correspondientes a esta región del LBP, que incluyen o no sustituciones seleccionadas en residuos particulares; las secuencias peptídicas correspondiente a esta región del LBP, con capacidad de unirse y neutralizar el LPS fueron objeto de un aporte previo de nuestro grupo¹⁴. El tema de la presente invención son, en particular, aquellas secuencias resultantes de sustituciones únicas o múltiples de residuos aminoacídicos en posiciones dadas de la serie que determinan un óptimo efecto neutralizante.

En un primer enfoque, la invención trata de péptidos derivados del LBP, caracterizados por su capacidad de antagonizar la interacción LPS:LBP y de inhibir los efectos biológicos desatados por el LPS, los que presentan en las posiciones +1, +5, +6, +7, +9, +10, +11, +12 y +13 aminoácidos esenciales, seleccionados además de otros preferidos en otras posiciones dentro de la secuencia que se describe, para un óptimo desempeño de las propiedades de la neutralización del LPS. Aquí, se definen como aminoácidos esenciales aquellos fundamentales para expresar de forma óptima las propiedades de los péptidos neutralizantes del LPS.

En un enfoque preferido, la presente invención provee péptidos que unen al LPS y lo neutralizan eficazmente, los cuales tienen una secuencia aminoacídica derivada de la región comprendida entre los aminoácidos 86-99 de la proteína madura (secuencia no.1) pero con las sustituciones seleccionadas de aminoácidos en sitios particulares dentro de este dominio. Los péptidos preferidos de la presente

invención son aquellos con la secuencia aminoacídica X-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-Y, donde:

X es una cadena lineal de cero hasta cuatro D- o L-aminoácidos.

(1) es uno de los aminoácidos D- o L-alanina, D- o L-treonina, D- o L-glutamina, D- o L-asparagina o D- o L-serina, y sí y solo sí al menos uno de los aminoácidos de las posiciones +5, +9, +10, +11 ó +13 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (1) podrá ser también D- o L-arginina o D- o L-lisina.

(2) es uno de los aminoácidos D- o L-alanina, D- o L-valina, D- o L-isoleucina, D- o L-leucina, D- o L-fenilalanina, D- o L-metionina, D- o L-triptofano o D- o L-tirosina.

(3) es uno de los aminoácidos D- o L-glutamina, D- o L-asparagina, D- o L-serina, o D- o L-treonina.

(4) es uno de los aminoácidos D- o L-glicina, D- o L-alanina, D- o L-valina, D- o L-isoleucina, D- o L-leucina, D- o L-fenilalanina, D- o L-metionina, D- o L-triptofano o D- o L-tirosina.

(5) es uno de los aminoácidos D- o L-alanina, D- o L-treonina, D- o L-glutamina, D- o L-asparagina ó D- o L-serina, y sí y solo sí al menos uno de los aminoácidos de las posiciones +1, +9, +10, +11 ó +13 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (5) podrá ser también D- o L-arginina o D- o L-lisina.

(6) es uno de los aminoácidos D- o L-triptofano o D- o L-fenilalanina

(7) es uno de los aminoácidos D- o L-lisina o D- o L-arginina

(8) es uno de los aminoácidos D- o L-alanina, D- o L-valina, D- o L-isoleucina, D- o L-leucina, D- o L-fenilalanina y D- o L-tirosina.

(9) es uno de los aminoácidos D- o L-alanina, D- o L-treonina, D- o L-glutamina, D- o L-asparagina o D- o L-serina, y sí y solo sí al menos uno de los aminoácidos de las posiciones +1, +5, +10, +11 ó +13 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (9) podrá ser también D- o L-arginina o D- o L-lisina.

(10) es uno de los aminoácidos D- o L-alanina, D- o L-valina, D- o L-isoleucina, D- o L-leucina, D- o L-fenilalanina, D- o L-metionina, D- o L-triptofano o D- o L-tirosina, y sí y solo sí al menos uno de los aminoácidos de las posiciones +1, +5, +9, +11 ó

+13 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (10) podrá ser también D- o L-lisina o D- o L-arginina.

(11) es uno de los aminoácidos D- o L-alanina o D- o L-valina; sí y solo sí al menos uno de los aminoácidos de las posiciones +1, +5, +9, +10, o +13 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (11) podrá ser también D- o L-serina; y si y solo sí el aminoácido de la posición +10 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (11) podrá ser también D- o L-treonina, D- o L-glutamina, D- o L-asparagina, D- o L-lisina o D- o L-arginina.

(12) es uno de los aminoácidos D- o L-fenilalanina D- o L-triptófano o D- o L-tirosina.

(13) es uno de los aminoácidos D- o L-alanina, D- o L-treonina, D- o L-glutamina, D- o L-asparagina o D- o L-serina; sí y solo sí al menos uno de los aminoácidos de las posiciones +1, +5, +9, +10 ó +11 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (13) podrá ser también D- o L-fenilalanina, D- o L-arginina o D- o L-lisina; y si y solo sí el a.a de la posición +14 es D- o L-lisina o D- o L-arginina, entonces (13) podrá ser también D- o L-glicina.

(14) es uno de los aminoácidos D- o L-lisina, D- o L-arginina o D- o L-alanina, y sí y solo sí el aminoácido de la posición +13 ha sido sustituido de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (14) podrá ser también D- o L-valina D- o L-isoleucina, D- o L-leucina, D- o L-fenilalanina, D- o L-metionina, D- o L-triptofano o D- o L-tirosina.

Y es una cadena lineal de cero a cuatro D- o L-aminoácidos.

Ejemplos representativos de péptidos específicamente preferidos de la presente invención incluyen los correspondientes a las secuencias no. 2-63.

Las pruebas indican que los péptidos correspondientes a las secuencias descritas muestran propiedades ventajosas cuando se comparan con los péptidos que presentan otros aminoácidos en las posiciones mencionadas, que carecen de ellos, o que son sustituidos en las posiciones descritas sin considerar las definiciones que esta invención describe.

De modo específico los péptidos correspondientes a las secuencias aquí descritas muestran propiedades ventajosas con respecto a los péptidos cuya secuencia

reproduce exactamente la de la proteína LBP nativa, correspondiendo con o incluyendo esta región, o parte de ella.

En estas sustituciones puntuales, o combinaciones de ellas, se basa la superioridad funcional de estos péptidos con respecto a péptidos descritos previamente¹⁰⁻¹⁴. En esos otros casos, se describen como regiones de unión y neutralización del LPS segmentos peptídicos que incluyen parcial o totalmente los que aquí se presentan, pero manteniendo la secuencia nativa del LBP o no declarando el carácter esencial de las sustituciones individuales y de su combinación como aquí se describen. El carácter neutralizante o antagónico de los péptidos previamente descritos, que no incluyen de modo esencial las sustituciones aquí definidas, es varias veces inferior al resultante de las modificaciones que el presente documento describe. Péptidos cuya secuencia incluye las sustituciones definidas en las secuencias no. 64-66, u otras diferentes a las aquí definidas para estas posiciones (+6, +7 y +12) carecen de capacidad neutralizante del LPS.

Las sustituciones en las otras posiciones (+1, +5, +9, +10, +11 y +13), como las que se ilustran en las secuencias 2-63, incrementan significativamente y de manera inesperada la capacidad de los péptidos de bloquear la interacción proteína LBP:LPS y de inhibir el efecto del LPS sobre células inflamatorias.

Las sustituciones presentes en los péptidos que aquí se describen confieren esta cualidad no esperada, a diferencia del efecto de algunas de las mismas sustituciones en la proteína nativa, de acuerdo a descripciones previas de otros autores¹⁶. Esto último es índice de diferencias entre la unión de los péptidos aquí descritos y el LPS con respecto a la interacción entre la proteína LBP, o incluso entre otros segmentos de la región N-terminal de la misma, y el LPS.

Este invento también se refiere a péptidos con las secuencias aquí descritas que están obligados a adoptar una conformación cíclica por medio de un enlace disulfuro formado entre dos residuos de cisteína añadidos a sus extremos N- y C- respectivamente, o bien mediante enlaces amida formados entre cadenas laterales de sus amino ácidos constituyentes.

También se contempla en este invento que personas capacitadas pueden hacer derivados de los péptidos preferidos descritos anteriormente, modificando los residuos de aminoácidos, sin que las moléculas resultantes pierdan las propiedades

de enlace y neutralización eficiente del LPS. Esas personas son también capaces de sustituir residuos aminoácidos por a.a. no naturales homólogos, manteniendo las propiedades neutralizantes de la molécula completa, así como de sustituir la cadena principal de sostén ó esqueleto por compuestos orgánicos que la mimeticen. En otro enfoque, este invento se refiere a polipéptidos híbridos que contienen las secuencias de péptidos mencionadas con los aminoácidos esenciales en las posiciones descritas, donde las secuencias de péptidos preferidas constituyen el extremo N-terminal o C-terminal de cadenas polipéptidas mayores en tal forma que mantienen su eficiente capacidad de unirse a y neutralizar el LPS y confiere esta capacidad al polipéptido híbrido. Un polipéptido híbrido preferido comprende la fusión de cualquiera de los péptidos preferidos y regiones de cadena pesada o de cadena ligera de la IgG.

Este invento también se refiere a proteínas "scaffold" (o estructura de soporte) que exponen adecuadamente una de las secuencias peptídicas preferidas en tal forma que mantiene o aumenta su capacidad de unirse a y neutralizar el LPS y le confiere esta capacidad al polipéptido híbrido. El término "proteínas scaffold", como es aquí utilizado se refiere a moléculas que admiten incluir dentro de su cadena polipeptídica, una o más de las secuencias aquí seleccionadas, en tal forma que el segmento insertado adopte una estructura funcional en el marco de la proteína o polipéptido que funciona, a su vez, como soporte estructural.

También este invento se refiere a dos o más repeticiones de una o varias de las secuencias preferidas en una cadena polipeptídica lineal, o su combinación en tal forma que las secuencias preferidas se conectan por brazos de enlace, siendo dímeros o multímeros de una misma secuencia o combinaciones de dos o más de ellas. Así mismo se contempla la combinación de una de las secuencias preferidas con otras secuencias peptídicas, de modo tal que el polipéptido nuevo tiene una capacidad de enlazarse y neutralizar el LPS significativamente superior a la evidenciada previamente para péptidos que incluyen total o parcialmente a esta región de la proteína LBP en su forma nativa o con sustituciones diferentes a las esenciales aquí descritas. Los brazos de enlace preferidos son aquellos que tienen entre 12 y 25 residuos de aminoácidos y que son ricos en los residuos Gly Ala, Pro y Ser.

Por otro lado, la presente invención incluye arreglos de tres o más copias de las secuencias peptídicas preferidas unidas por sus extremos C-terminales a un núcleo de lisinas, los cuales tienen la capacidad de unir y neutralizar eficazmente el LPS. Del mismo modo estos arreglos de secuencias preferidas pueden resultar de la combinación de estructuras cíclicas obtenidas a partir de la adición de residuos cisteína para formar enlaces disulfuro o por formación de enlaces amida utilizando las cadenas laterales de los aminoácidos constituyentes.

Los péptidos sintéticos que tienen las secuencias preferidas descritas son moléculas pequeñas con una más amplia utilidad que polipéptidos mayores. Los péptidos de la presente invención tienen ventajas sobre polipéptidos mayores derivados de la proteína LBP dada su menor inmunogenicidad, y un mayor espectro de actividad neutralizante sobre el LPS, por su capacidad de unión a LPS derivado de distintas cepas Gram-negativas, incluyendo aquellas de cubiertas de LPS con largas cadenas de polisacáridos de fuerte empaquetamiento, como el *Proteus mirabilis*. La vida útil del péptido *in vivo* y otros parámetros farmacológicos pueden ser mejorados con polipéptidos y proteínas híbridas ó “scaffold” que incluyan las secuencias peptídicas preferidas.

Todos los péptidos que abarca el presente invento pueden ser preparados usando los procedimientos patrones para la síntesis de péptidos, incluyendo, por ejemplo la técnica sintética de fase sólida descrita por Merrifield¹⁷, así como otros que pueden hacerse por personas calificadas.

En otro enfoque preferido, este invento provee composiciones farmacéuticas que comprenden diluyentes, portadores o adyuvantes apropiados desde un punto de vista farmacológico, y cantidades efectivas de uno o más péptidos, de los arreglos peptídicos lineales o en estructura múltiple, o del híbrido o proteína “scaffold” que contiene su(s) secuencia(s). El término “cantidad efectiva” como aquí se usa se refiere a la cantidad de péptidos, polipéptidos híbridos, o proteína “scaffold” que contiene su(s) secuencia(s), que es suficiente para mejorar los síntomas asociados con las respuestas sistémicas al LPS.

Las composiciones farmacéuticas novedosas pueden ser útiles en los métodos de tratamiento de varias afecciones asociadas con la liberación del LPS, particularmente la sepsis por bacterias Gram-negativas y secuelas como la

endotoxemia y el shock, el Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (SIRS), el Síndrome de Respuesta Compensatoria Anti-inflamatoria (CARS), la Coagulación Intravascular Diseminada, el Síndrome de Distress Respiratorio del Adulto y el Síndrome de Disfunción de Organos Múltiples (MODS). El método terapéutico lleva a mejorar uno o varios síntomas de pacientes que sufren o están en riesgo de desarrollar estas afecciones, de causas muy diversas como infección, trauma, quemaduras y pancreatitis. Los pacientes que también pueden necesitar tal tratamiento incluyen aquellos afectados por enfermedades inflamatorias intestinales, ictero obstructivo u otras enfermedades donde está afectada la barrera gastrointestinal y esté favorecida la translocación bacteriana o de endotoxina.

También las secuencias de ADN que codifican los péptidos preferidos de esta invención, o que codifican los híbridos y proteínas “scaffold” que contienen estas secuencias peptídicas, pueden ser insertadas en los vectores adecuados para ser expresadas *in vivo* con propósitos terapéuticos o profilácticos, conjuntamente con los portadores, diluentes, adyuvantes o soluciones estabilizadoras o sustancias químicas apropiadas.

EJEMPLOS DE REALIZACION

EJEMPLO 1.

Este ejemplo describe la capacidad de los péptidos preferidos de esta invención, de bloquear la interacción entre la proteína LBP y el LPS de *E.coli*. Se utilizó un ensayo tipo ELISA en el que se determina la unión de LPS marcado con biotina al LBP humano recombinante (LBPhr), en diferentes concentraciones y en ausencia o presencia de una concentración fija de los péptidos en evaluación. El LPS se marcó con biotina usando un procedimiento estándar conocido por personas especializadas. El LBP es previamente unido a la superficie sólida con el empleo de un anticuerpo policlonal específico, purificado por cromatografía de afinidad utilizando Proteína A-Sepharose (*Pharmacia*). Mezclas de concentraciones fijas del LPS biotinilado y de cada péptido son incubadas por 2h a TA y son luego añadidas, en un volumen final de 100 uL, a los pozuelos que contienen el LBPhr. De este modo se determina como la unión en solución péptido:LPS afecta la interacción del LPS con el LBPhr unido a la placa. En la *Fig. 1* se muestra el efecto de la pre-incubación del LPS-biotina con los péptidos LBP₈₆₋₉₉, LBP_{A90}, LBP_{A94} y LBP_{A86} (estos

últimos tres, entre los preferidos de esta invención) sobre la interacción del LPS marcado con la proteína LBP. La *Fig. 2* muestra el resultado de la evaluación en el mismo ensayo de los péptidos LBP_{A95}, LBP_{A96} y LBP_{A98} y en la *Fig. 3* se representan los resultados para el caso de los péptidos LBP_{A91}, LBP_{A92} y LBP_{A97}. En todos los ensayos representados se incluye la condición de interacción proteína LBP:LPS-biotina en ausencia de péptido, el resultado en presencia del LBP₈₆₋₉₉, y en la *Fig. 2* la presencia de un péptido catiónico no relacionado, C5,3.

La interacción proteína LBP:LPS se bloqueó de modo significativo con péptidos sustituidos de acuerdo a lo preferido en la presente invención, como se representa para los casos de LBP_{A86}, LBP_{A90}, LBP_{A94}, LBP_{A95}, LBP_{A96} y LBP_{A98} y se favoreció con la sustitución de aminoácidos esenciales para lograr el efecto inhibitorio óptimo, como aquí se describe y se representa para el caso de los péptidos LBP_{A91}, LBP_{A92} y LBP_{A97}.

Estos resultados demuestran que los péptidos que comprenden las secuencias preferidas de la presente invención poseen una mayor capacidad de bloqueo de esta interacción LBP:LPS que el péptido LBP₈₆₋₉₉ cuya secuencia corresponde a la de la proteína nativa. Este ejemplo evidencia que las sustituciones descritas en la presente invención son esenciales para lograr el efecto inhibitorio óptimo de péptidos derivados de esta región de la proteína LBP sobre la interacción LPS:LBP, en buena medida necesaria para desencadenar la respuesta tisular al lipopolisacárido.

Del mismo modo este ejemplo demuestra que la sustitución de a.a. particulares en las posiciones mencionadas por otros diferentes a los aquí descritos, reduce o elimina la capacidad neutralizante de estos fragmentos peptídicos.

EJEMPLO 2.

Para determinar si los péptidos de la presente invención son capaces de neutralizar las respuestas mediadas por el LPS, se evaluó la capacidad de los péptidos de bloquear la producción de TNF inducida por el LPS en células de sangre periférica humana. En esta prueba se evalúa la producción de TNF por células mononucleares de sangre periférica humana inducida por concentraciones de LPS comúnmente encontradas en pacientes sépticos. El LPS (2 ng/mL) se incubó con una concentración fija de los péptidos durante 2 horas a 37°C y luego se agregaron las

mezclas en 100 uL a un volumen semejante de suspensión de células mononucleares. El medio de la suspensión celular ya contenía LBP humano recombinante, 200 ng/mL. Los cultivos se mantuvieron siempre a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se midió el TNF α después de 18-24 horas en el sobrenadante de los cultivos, utilizando un ELISA específico para TNF α humano. Los resultados de tres experimentos diferentes se expresan como promedio en la Fig. 4. Se observaron niveles significativamente reducidos de citocina en los cultivos que contenían LPS de *E.coli* 0111:B4 (1ng/mL) y cualquiera de los péptidos LBP₈₆₋₉₉, LBP_{A94}, LBP_{A95}, y LBP_{A98}. Entre ellos los últimos tres péptidos, preferidos de esta invención, evidenciaron un efecto inhibitorio superior al péptido LBP₈₆₋₉₉. Se observaron resultados similares cuando se usaron en los ensayos 2 ó 10 ng/mL del LPS de *E.coli* y concentraciones de LBPhr de 20 ó 100 ng/mL. El péptido catiónico no relacionado, B6,1, no modificó la producción del TNF en el mismo ensayo. Por otra parte, el péptido LBP_{A91} donde se ha introducido una sustitución a.a. no adecuada en la posición (6), de acuerdo a lo que aquí se define, no posee capacidad neutralizante.

Estos resultados indican la importancia de las sustituciones descritas para el despliegue óptimo de la capacidad de los péptidos derivados de esta región del LBP de inhibir los efectos biológicos del LPS sobre células mononucleares humanas, sugiriendo su utilidad para el desarrollo de métodos profilácticos y terapéuticos de la sepsis, el Síndrome de Respuesta Sistémica Inflamatoria y otras afecciones relacionadas. La potencia de los péptidos preferidos de este invento disminuyendo la liberación de citocinas pro-inflamatorias, está aquí adecuadamente demostrada usando concentraciones de endotoxinas comúnmente halladas en pacientes endotoxémicos.

EJEMPLO 3

La presencia de los aminoácidos “seleccionados” en las posiciones +1, +5, +6, +7, +9, +10, +11, +12 y +13 de las secuencias descritas en la presente invención resultan esenciales para el adecuado despliegue de la actividad inhibitoria sobre respuestas desencadenadas por LPS. Los péptidos cuyas secuencias se derivan del LBP que constituyen un aporte preferido de la presente invención portan los aminoácidos seleccionados en las posiciones +1, +5, +6, +7, +9, +10, +11, +12 y

+13 lo que les proporciona ventajas primarias e inesperadas sobre otros péptidos que carecen de los mencionados aminoácidos “seleccionados” para estas posiciones. Entre otros péptidos derivados del LBP, varios previamente descritos¹¹⁻¹⁴ disminuyen las respuestas biológicas inducidas por el LPS pero con potencia significativamente inferior a la de los péptidos preferidos de la presente invención. Para demostrar la ventaja de los péptidos de este invento sobre los previamente descritos, se evaluó la capacidad inhibitoria de algunos de ellos sobre respuestas inducidas por LPS; la comparación del efecto de los diferentes péptidos sobre la producción de IL-6 inducida por LPS en experimentos con células mononucleares de sangre periférica humana es ilustrada en la Fig.5. El procedimiento experimental fue similar al descrito en el EJEMPLO 2. El LPS (2 ng/mL) se incubó con los péptidos durante 2 horas a 37°C y las mezclas se agregaron entonces a los cultivos de células mononucleares. Los cultivos siempre se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, y se realizaron en presencia de concentraciones conocidas de LBPhr (20 ó 100 ng/mL). La IL-6 se midió en el sobrenadante después de 18 h de cultivo, utilizando un ELISA específico para IL-6 humana. En estos experimentos se evaluó el efecto de los siguientes péptidos: LBP₈₆₋₉₉, LBP-H (LBP₈₈₋₁₀₁, secuencia no.67)¹³, LBP_{A94}, LBP_{A95} y LBP_{A98}. La Fig. 5 representa la producción de IL-6 por células mononucleares tratadas con una proporción péptido:LPS (*E.coli*) de 1000:1 (peso:peso). Sólo los péptidos LBP_{A94}, LBP_{A95} y LBP_{A98}, que ilustran sustituciones esenciales descritas en este invento, y que tiene aminoácidos esenciales en las posiciones +9, +10, y +13, fueron capaces de inhibir la producción de IL-6 en más de un 35%, demostrando la importancia de estas sustituciones para el despliegue adecuado de aquellas propiedades atrayentes para propósitos profilácticos y terapéuticos. El péptido LBP_{A95} inhibió la respuesta de células mononucleares al LPS en más de un 70%, en presencia de concentraciones de LBPhr de 20 y 100 ng/mL.

EJEMPLO 4

Se utilizó un modelo animal de shock endotóxico para conocer si los péptidos de este invento eran capaces de bloquear respuestas fisiológicas complejas al LPS. Esta capacidad pudiera ser de relevancia para la práctica clínica. En este modelo, los ratones fueron sensibilizados con Actinomicina D para incrementar la respuesta

desatada por LPS. Con este propósito, se administró la Actinomicina D (7.5µg) i.p. a ratones hembras de 6-8 semanas de edad. Simultáneamente con la Actinomicina D, cada ratón recibió LPS y se evaluó la supervivencia cada 24 horas durante 120 horas después del reto. El efecto de los péptidos del presente invento en la supervivencia de los ratones retados con LPS de *E.coli* se evaluó por la administración de LPS (1 µg/ratón en vehículo salino) o mezclas de LPS:péptido previamente incubadas durante 2 horas a 37°C. La Fig. 6 representa la supervivencia de los ratones después de la inyección intraperitoneal del LPS más 5 ug de los siguientes péptidos: LBP₈₆₋₉₉, LBP_{A94}, LBP_{A95}, LBP_{A98} ó el péptido catiónico no relacionado B6,1. La supervivencia de los ratones se incrementó significativamente solo por la administración de los péptidos LBP_{A94}, LBP_{A95}, ó LBP_{A98} (*p< 0.05 vs. el vehículo ó el HCV). El péptido LBP₈₆₋₉₉ no brindó un efecto beneficioso en la supervivencia de los ratones cuando se administró en esta dosis, lo que evidencia la superior eficacia de los péptidos con las sustituciones preferidas de esta invención. El efecto neutralizante de los péptidos de la presente invención sobre respuestas tóxicas del LPS desatadas *in vivo* destaca el valor de los péptidos mencionados para la aplicación de métodos profilácticos o terapéuticos en las sepsis u otra afección asociada. Así, los resultados indican que los péptidos de este invento retienen sus propiedades bloqueadoras cuando son probados bajo condiciones fisiopatológicas, demostrando su potencia farmacológica. Particularmente, estos resultados destacan la importancia de la presencia de sustituciones en las posiciones +1, +5, +9, +10, +11 y +13 para garantizar la propiedad de los péptidos derivados del LBP de alcanzar una neutralización efectiva *in vivo* de las respuestas al LPS, lo que constituye el enfoque especialmente preferido del presente invento.

Lic. Mariela Vázquez Castillo

Representante Legal, CIGB



BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS FIGURAS.

ANÁLOGOS DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS DERIVADAS DE LA PROTEÍNA QUE ENLAZA LIPOPOLISACÁRIDO (LPS), QUE POSEEN UNA EFICIENTE CAPACIDAD DE NEUTRALIZACIÓN DEL LPS.

Figura 1. Muestra la capacidad inhibitoria de distintos péptidos de la presente invención (LBP_{A86}, LBP_{A90} y LBP_{A94}) sobre la interacción entre el LPS *E.coli* y la proteína LBP humana recombinante, esta última unida a una superficie sólida con el empleo de un anticuerpo policlonal específico. El enlace del LPS marcado con biotina se determinó usando estreptavidina-peroxidasa. Se utilizaron como controles experimentales la interacción en ausencia de péptido y el efecto de la presencia del péptido LBP₈₆₋₉₉ previamente descrito por su capacidad de afectar esta interacción.

Figura 2. Muestra la capacidad inhibitoria de otros péptidos de la presente invención (LBP_{A95}, LBP_{A96} y LBP_{A98}) sobre la interacción entre el LPS *E.coli* y la proteína LBP humana recombinante. Se utilizaron condiciones experimentales semejantes a las descritas para la Fig.1. Se incluyó en este caso como control de no inhibición de la interacción la presencia del péptido catiónico no relacionado C5,3.

Figura 3. Muestra como sustituciones no adecuadas de a.a. en posiciones esenciales (péptidos LBP_{A91}, LBP_{A92} y LBP_{A97}), según describe el presente invento, afectan la capacidad de los péptidos de la presente invención de inhibir la interacción entre el LPS *E.coli* y la proteína LBP humana recombinante. Se utilizaron condiciones experimentales semejantes a las descritas para la Fig.1.

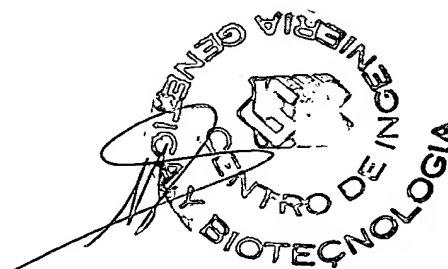
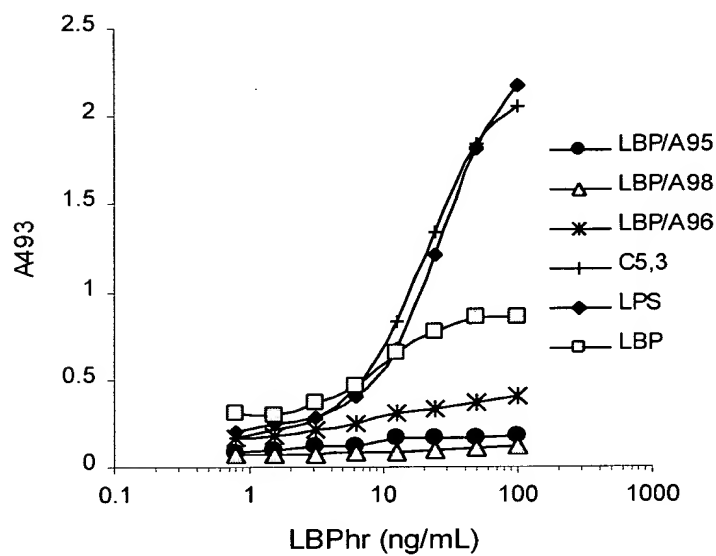
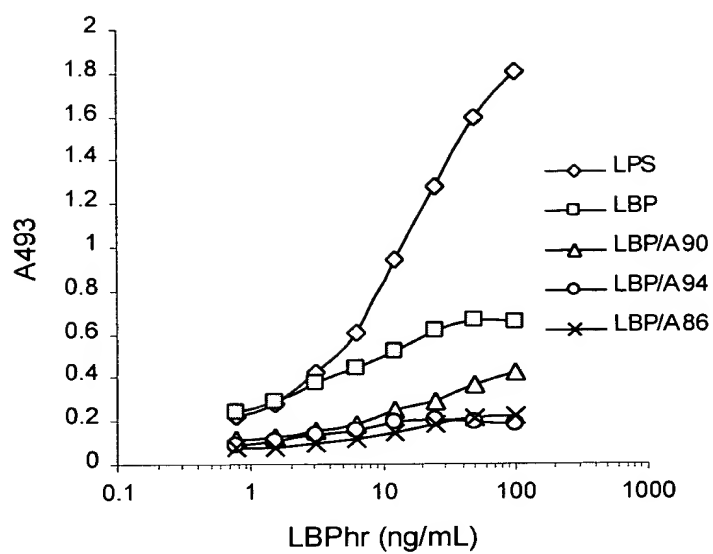
La figura 4 muestra el efecto de diferentes péptidos de la presente invención (LBP_{A94}, LBP_{A95} y LBP_{A98}) sobre la producción de TNF inducida por LPS de *E.coli* en células mononucleares de sangre periférica humana. Además, se muestra la pérdida de la capacidad neutralizante para un péptido con una sustitución no adecuada de a.a. en una posición esencial (péptido LBP_{A91}), según describe el presente invento. Se utilizaron como controles experimentales la inducción de TNF en ausencia de péptido, el efecto de la presencia del péptido LBP₈₆₋₉₉ y del polimixin B (PMB), ambos capaces de neutralizar este efecto del LPS aunque en diferente grado, y la presencia del péptido catiónico no relacionado B6,1 como control negativo.

Figura 5. Muestra el efecto de diferentes péptidos de la presente invención (LBP_{A94}, LBP_{A95} y LBP_{A98}) sobre la producción de IL-6 inducida por LPS de *E.coli* en células mononucleares de sangre periférica humana. Los resultados se expresan como % de inhibición de la producción del IL-6 en comparación con la liberación del IL-6 inducida por el LPS en ausencia de los péptidos. Se incluyó la evaluación del efecto de otros péptidos cuya capacidad neutralizante de los efectos del LPS ha sido previamente descrita (LBP₈₆₋₉₉ y LBP-H) y la presencia del péptido catiónico no relacionado B6,1 como control negativo.

Figura 6. Muestra los datos de supervivencia para grupos de 10 ratones retados por la administración i.p. de una dosis letal de LPS de *E.coli* y tratados simultáneamente con cantidades equimolares de diferentes péptidos de la presente invención (LBP_{A94}, LBP_{A95} y LBP_{A98}), así como del péptido LBP₈₆₋₉₉ (previamente descrito por su capacidad de incrementar la supervivencia pero en dosis 3 veces superiores a las aquí empleadas) y del péptido B6,1, utilizado como control negativo. La supervivencia se registró cada 24 horas durante 120 horas.

Lic. Mariela Vázquez Castillo
Representante Legal, CIGB





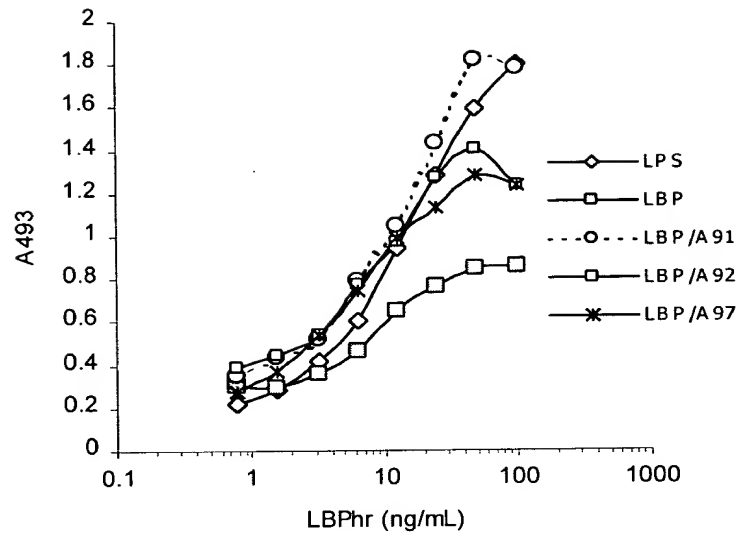


Fig. 3

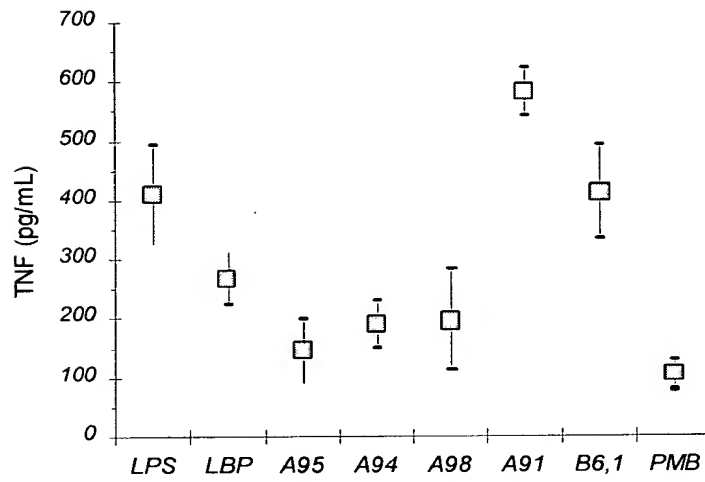


Fig.4

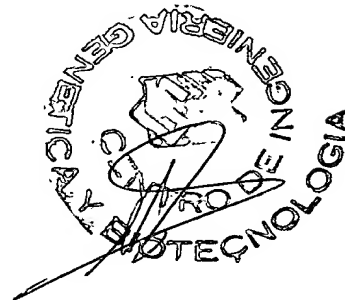


Fig. 5

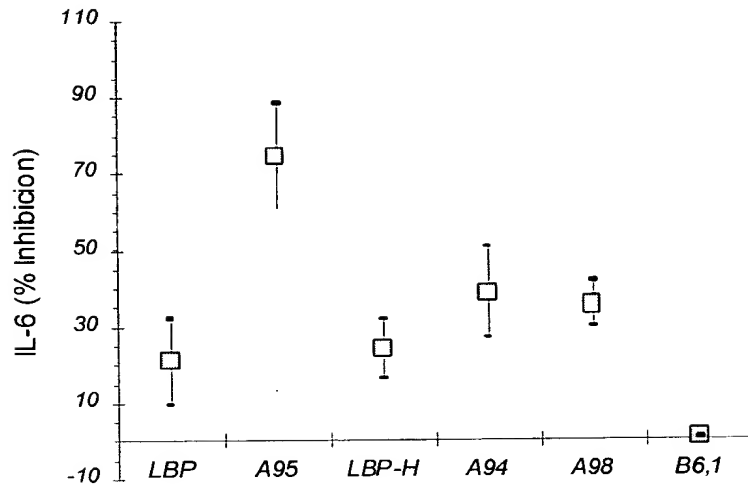
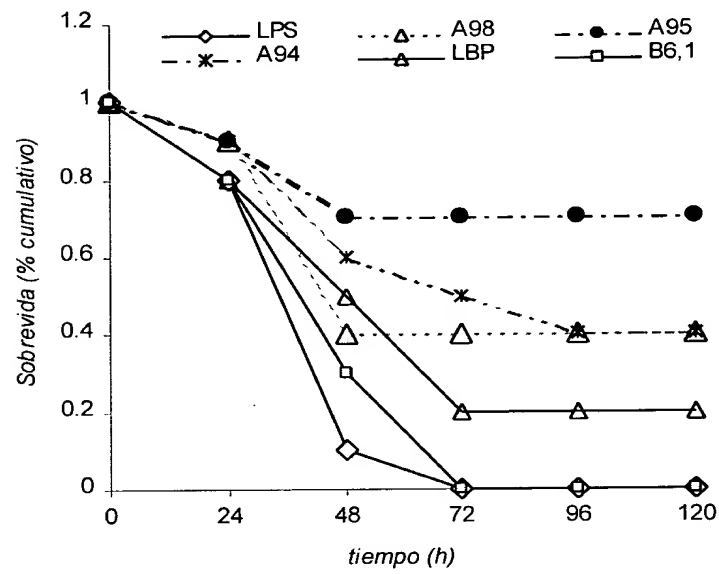


Fig. 6



Lista de secuencias

Número de secuencias: 67

(1) Información de la secuencia no.1 (LBP₈₆₋₉₉)

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP)
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRKSFFK

(2) Información de la secuencia no.2 (LBP_{A86})

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear.

AVQGRWKVRKSFFK

(3) Información de la secuencia no.3 (LBP_{A90})

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGAWKVRKSFFK

(4) Información de la secuencia no.4 (LBP_{A94})

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVAKSFFK

(5) Información de la secuencia no.5 (LBP_{A95})

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos

- b. Longitud: 14 aminoácidos
 - c. Tipo de molécula: proteína
 - d. Fuente original: secuencia no.1
 - e. Propiedades: secuencia linear
- RVQGRWKVRASFFK

(6) Información de la secuencia no.6 (LBP_{A96})

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
 - b. Longitud: 14 aminoácidos
 - c. Tipo de molécula: proteína
 - d. Fuente original: secuencia no.1
 - e. Propiedades: secuencia linear
- RVQGRWKVRKAFFK

(7) Información de la secuencia no.7 (LBP_{A98})

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
 - b. Longitud: 14 aminoácidos
 - c. Tipo de molécula: proteína
 - d. Fuente original: secuencia no.1
 - e. Propiedades: secuencia linear
- RVQGRWKVRKSFAK

(8) Información de la secuencia no.8

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
 - b. Longitud: 14 aminoácidos
 - c. Tipo de molécula: proteína
 - d. Fuente original: secuencia no.1
 - e. Propiedades: secuencia linear
- AVQGRWKVRKSFAK

(9) Información de la secuencia no.9

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVQGRWKVRASFFK

(10) Información de la secuencia no.10

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVQGAWKVRKSFFK

(11) Información de la secuencia no.11

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVQGRWKVAKSFFK

(12) Información de la secuencia no.12

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVQGRWKVRKAFFK

(13) Información de la secuencia no.13

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGAWKVAKSFFK

(14) Información de la secuencia no.14

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos

- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGAWKVRASFFK

(15) Información de la secuencia no.15

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGAWKVRKAFFK

(16) Información de la secuencia no.16

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGAWKVRKSFAA

(17) Información de la secuencia no.17

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVAKAFFK

(18) Información de la secuencia no.18

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVAKSFAK

(19) Información de la secuencia no.19

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRKAFAK

(20) Información de la secuencia no.20

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRASFAK

(21) Información de la secuencia no.21

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RFQGRWKVRASFFK

(22) Información de la secuencia no.22

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVSGRWKVRASFFK

(23) Información de la secuencia no.23

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína

d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

RVNGRWKVRASFFK

(24)Información de la secuencia no.24

a. Tipo de secuencia: aminoácidos

b. Longitud: 14 aminoácidos

c. Tipo de molécula: proteína

d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

RVQMRWKVRASFFK

(25)Información de la secuencia no.25

a. Tipo de secuencia: aminoácidos

b. Longitud: 14 aminoácidos

c. Tipo de molécula: proteína

d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

RVQFRWKVRASFFK

(26)Información de la secuencia no.26

a. Tipo de secuencia: aminoácidos

b. Longitud: 14 aminoácidos

c. Tipo de molécula: proteína

d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKFRASFFK

(27)Información de la secuencia no.27

a. Tipo de secuencia: aminoácidos

b. Longitud: 14 aminoácidos

c. Tipo de molécula: proteína

d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRAQFFK

(28)Información de la secuencia no.28

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRASWFK

(29)Información de la secuencia no.29

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRASFFA

(30)Información de la secuencia no.30

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRASFQV

(31)Información de la secuencia no.31

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVSGRWKVRASFAK

(32)Información de la secuencia no.32

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear
RVSGRWKVRASFQV

(33)Información de la secuencia no.33

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVQGRWKVRASFTV

(34)Información de la secuencia no.34

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRVSFFK

(35)Información de la secuencia no.35

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVQGRWKVRVSFFK

(36)Información de la secuencia no.36

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVSGRWKVRVSFFK

(37)Información de la secuencia no.37

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos

- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRVSFAK

(38)Información de la secuencia no.38

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRVSFQV

(39)Información de la secuencia no.39

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRVTFFK

(40)Información de la secuencia no.40

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWRVRVKFTV

(41)Información de la secuencia no.41

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWRVRVAFK

(42) Información de la secuencia no.42

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVQGRWRVRVSFAK

(43) Información de la secuencia no.43

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVQGRWRVRVSFQV

(44) Información de la secuencia no.44

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVSGRWRVRVSFAK

(45) Información de la secuencia no.45

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVSGRWRVRVSFQV

(46) Información de la secuencia no.46

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos

- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWRVRVTFQV

(47) Información de la secuencia no.47

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVSGRWRVRVTFAK

(48) Información de la secuencia no.48

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVSGRWRVRVTFQV

(49) Información de la secuencia no.49

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWRVAKSFQV

(50) Información de la secuencia no.50

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVQGRWRVAKSFGK

(51) Información de la secuencia no.51

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVQGRWRVAKSFQV

(52) Información de la secuencia no.52

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVSGRWRVAKAFGK

(53) Información de la secuencia no.53

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVSGRWRVAKAFQV

(54) Información de la secuencia no.54

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1
- e. Propiedades: secuencia linear

AVSGRWRVKVAFQV

(55) Información de la secuencia no.55

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína

d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

RVQGAWKVRASFAK

(56)Información de la secuencia no.56

a. Tipo de secuencia: aminoácidos

b. Longitud: 14 aminoácidos

c. Tipo de molécula: proteína

d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

RVQGAWKVRASFQV

(57)Información de la secuencia no.57

a. Tipo de secuencia: aminoácidos

b. Longitud: 14 aminoácidos

c. Tipo de molécula: proteína

d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

AVQGAWKVRASFAK

(58)Información de la secuencia no.58

a. Tipo de secuencia: aminoácidos

b. Longitud: 14 aminoácidos

c. Tipo de molécula: proteína

d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

AVQGAWKVRASFQV

(59)Información de la secuencia no.59

f. Tipo de secuencia: aminoácidos

g. Longitud: 18 aminoácidos

h. Tipo de molécula: proteína

f. Fuente original: Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP)

i. Propiedades: secuencia linear

TVRVQGRWKVRASFFKLQ

(60)Información de la secuencia no.60

- j. Tipo de secuencia: aminoácidos
- k. Longitud: 18 aminoácidos
- l. Tipo de molécula: proteína
- g. Fuente original: Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP)
- m. Propiedades: secuencia linear

TVRVQGAWKVRASFFKLQ

(61) Información de la secuencia no.61

- n. Tipo de secuencia: aminoácidos
- o. Longitud: 18 aminoácidos
- p. Tipo de molécula: proteína
- h. Fuente original: Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP)
- q. Propiedades: secuencia linear

TVRVQGRWKVRASFAKLQ

(62) Información de la secuencia no.62

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 17 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- i. Fuente original: Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP)
- d. Propiedades: secuencia linear

SVRVQGRWKVRASFAVT

(63) Información de la secuencia no.63

- e. Tipo de secuencia: aminoácidos
- f. Longitud: 24 aminoácidos
- g. Tipo de molécula: proteína
- j. Fuente original: Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP)
- h. Propiedades: péptido cíclico

CRVQGAWKVRKSFFKLQGSFVDSC

(64) Información de la secuencia no.64 (LBP_{A92})

- a. Tipo de secuencia: aminoácidos
- b. Longitud: 14 aminoácidos
- c. Tipo de molécula: proteína
- d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWAVRKSFFK

(65) Información de la secuencia no.65 (LBP_{A97})

a. Tipo de secuencia: aminoácidos

b. Longitud: 14 aminoácidos

c. Tipo de molécula: proteína

d. Fuente original: secuencia no.1

e. Propiedades: secuencia linear

RVQGRWKVRKSAFK

(66) Información de la secuencia no.66 (LBP_{A91})

f. Tipo de secuencia: aminoácidos

g. Longitud: 14 aminoácidos

h. Tipo de molécula: proteína

i. Fuente original: secuencia no.1

j. Propiedades: secuencia linear

RVQGRAKVRKSFFK

(67) Información de la secuencia no.67 (LBP₈₈₋₁₀₁)

k. Tipo de secuencia: aminoácidos

l. Longitud: 14 aminoácidos

m. Tipo de molécula: proteína

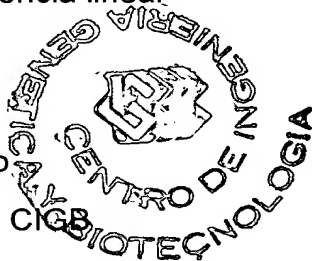
k. Fuente original: Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP)

n. Propiedades: secuencia linear

QGRWKVRKSFFKLQ

Lic. Mariela Vázquez Castillo

REPRESENTANTE LEGAL, CIGB



REIVINDICACIONES

ANÁLOGOS DE SECUENCIAS PEPTÍDICAS DERIVADAS DE LA PROTEÍNA QUE ENLAZA LIPOPOLISACÁRIDO (LPS), QUE POSEEN UNA EFICIENTE CAPACIDAD DE NEUTRALIZACIÓN DEL LPS.

1. Un péptido derivado del LBP pero con sustituciones básicas en su estructura primaria con respecto a la secuencia nativa, que tiene la capacidad de enlazarse y neutralizar eficazmente las respuestas mediadas por LPS y que:

(a) comprende la secuencia de aminoácidos 1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14, o parte de ella, donde:

X es una cadena lineal desde cero hasta cuatro D- o L-aminoácidos.

(1) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos alanina, treonina, glutamina, asparagina o serina, y si y solo si al menos uno de los aminoácidos de las posiciones +5, +9, +10, +11 ó +13 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (1) podrá ser también D- o L-arginina o lisina.

(2) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, metionina, triptofano y tirosina.

(3) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos glutamina, asparagina serina y treonina.

(4) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos glicina, alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, metionina, triptofano y tirosina.

(5) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos alanina, treonina, glutamina, asparagina y serina, y si y solo si al menos uno de los aminoácidos +1, +9, +10, +11 ó +13 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (5) podrá ser también D- o L-arginina o lisina.

(6) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos triptófano y fenilalanina.

(7) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos lisina y arginina.

(8) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos alanina, valina, isoleucina, leucina, fenilalanina y tirosina.

(9) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos alanina treonina, glutamina, asparagina y serina, y si y solo si al menos uno de los aminoácidos de las

posiciones +1, +5, +10, +11 ó +13 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (9) podrá ser también D- o L-arginina o lisina.

(10) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos alanina, valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, metionina, triptofano y tirosina, y sí y solo sí al menos uno de los aminoácidos de las posiciones +1, +5, +9, +11 ó +13 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (10) podrá ser también D- o L-lisina o arginina.

(11) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos alanina o valina; sí y solo sí al menos uno de los aminoácidos de las posiciones +1, +5, +9, +10 ó +13 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (11) podrá ser también D- o L-serina; y si y solo si el a.a. de la posición +10 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (11) podrá ser también D- ó L-glutamina, asparagina, treonina, lisina o arginina.

(12) se selecciona del grupo de D- ó L- aminoácidos fenilalanina, triptófano y tirosina.

(13) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos alanina, treonina, glutamina, asparagina y serina; sí y solo sí al menos uno de los aminoácidos de las posiciones +1, +5, +9, +10 o +11 ha sido sustituido en la secuencia original de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (13) podrá ser también D- o L-fenilalanina, arginina o lisina; y sí y solo sí el a.a de la posición +14 es D- o L-lisina o D- o L-arginina, entonces (13) podrá ser también D- o L-glicina.

(14) se selecciona del grupo de D- o L- aminoácidos lisina, arginina y alanina, y sí y solo sí el a.a. de la posición +13 ha sido sustituido de acuerdo a lo que aquí se describe, entonces (14) podrá ser también D- o L-valina, isoleucina, leucina, fenilalanina, metionina, triptofano o tirosina.


Y es una cadena lineal desde cero a cuatro D- o L-aminoácidos.

(b) posee residuos de aminoácidos esenciales en las posiciones descritas como +1, +5, +6, +7, +9, +10, +11, +12 y +13 y como preferidos aquellos que se describen en otras posiciones.

2. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1 que tiene la capacidad de enlazarse y neutralizar el LPS y que es la región N-terminal de un polipéptido mayor.
3. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1 que tiene capacidad de enlazarse y neutralizar el LPS y que es la región C-terminal de un polipéptido mayor.
4. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1 que tiene la capacidad de enlazarse y neutralizar el LPS el cual es insertado en la cadena lineal de un polipéptido mayor.
5. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1 en que al menos un amino ácido de la secuencia ha sido sustituido por un amino ácido homólogo no natural.
6. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1 en que el extremo N-terminal ha sido modificado por acetilación o succinilación.
7. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 2 donde el extremo N-terminal ha sido modificado por acetilación o succinilación.
8. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1 ó 3 donde el extremo C-terminal es un grupo $-OH$, $-COOH$ ó $-CONH_2$.
9. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1 que ha sido obligado a adoptar una conformación cíclica por una unión intramolecular tipo disulfuro o amida.
10. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 5 que ha sido obligado a adoptar una conformación cíclica por un enlace intramolecular de tipo disulfuro o amida.
11. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1 donde la cadena de sostén ha sido sustituida por entidades orgánicas miméticas del sostén.
12. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 5, 6, 9 ó 10 donde la cadena de sostén ha sido sustituida por entidades orgánicas miméticas del sostén.
13. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1, 5, 6, 9 ó 10, donde al menos un amino ácido de dichas secuencias ha sido sustituido por alquilación utilizando métodos químicos o enzimáticos.
14. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1, 5, 6, 9 o 10, donde al menos un aminoácido de dicha secuencia ha sido glicosilado usando métodos químicos o enzimáticos.
15. Un polipéptido de acuerdo a lo expuesto en 2, 3 ó 4, donde al menos un aminoácido de la secuencia expuesta en 1, ha sido glicosilado usando métodos químicos o enzimáticos

16. Una cadena polipeptídica lineal que contiene 2 ó más repeticiones de una misma secuencia peptídica de acuerdo a lo expuesto en 1 ó 5 conectadas por enlaces de 12 - 35 aminoácidos, ricos en residuos Gly, Ala, Pro ó Ser.
17. Una cadena polipeptídica lineal que contiene combinaciones de 2 ó más secuencias peptídicas de acuerdo a 1 ó 5 conectadas por enlaces de 12 - 25 aminoácidos, ricos en residuos de Gly, Ala, Pro ó Ser.
18. Un arreglo estructural de tres o más copias de secuencias peptídicas homologas o de combinaciones de diferentes secuencias peptídicas, de acuerdo a 1 ó 5, unidas por sus extremos C-terminales a un núcleo de lisinas.
19. Un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1, 5, 6, 8-12 ó 16-18 que está marcado con biotina, radioisótopos, enzimas, metales coloidales, compuestos fluorescentes, quimiluminiscentes, o fosforescentes.
20. Un vector recombinante que contiene una secuencia de ADN que codifica un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1.
21. Un vector recombinante que contiene una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de acuerdo a lo expuesto en 2 - 4.
22. Un microorganismo que porta un vector recombinante de acuerdo a lo expuesto en 20 ó 21 y que expresa el péptido o polipéptido así codificado.
23. Un vector recombinante que contiene una secuencia de ADN que codifica un péptido de acuerdo a lo expuesto en 1 y que expresa el péptido así codificado después de la transfección *in vitro* de células de mamíferos.
24. Un vector recombinante que contiene una secuencia de ADN que codifica un péptido de acuerdo con lo expuesto en 1 y que expresa dicho péptido así codificado después de la administración *in vivo*.
25. Un vector recombinante que contiene una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de acuerdo a lo expuesto en 2-4 y que expresa el polipéptido así codificado después de la transfección *in vitro* de células de mamíferos.
26. Un vector recombinante que contiene una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de acuerdo con lo expuesto en 2-4 y que expresa dicho polipéptido así codificado después de la administración *in vivo*.

27. Una composición farmacéutica que comprende cantidades efectivas de un péptido de acuerdo a lo expresado en 1, y un diluyente, portador o adyuvante aceptable.
28. Una composición farmacéutica que comprende cantidades efectivas de un péptido de acuerdo a lo expresado en 2-18, y un diluyente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
29. Una composición farmacéutica de acuerdo a lo expuesto en 27 ó 28 y que incluye un detergente farmacéuticamente aceptable.
30. El uso de una composición farmacéutica de acuerdo a lo expresado en 27-29 para el tratamiento del Síndrome de la Respuesta Inflamatoria Sistémica.
31. El uso de la composición farmacéutica de acuerdo a lo expresado en 27-29 para el tratamiento de sepsis por Gram-negativos y sus secuelas.
32. El uso de la composición farmacéutica de acuerdo a lo expuesto en 27-29 para el tratamiento del íctero obstructivo.
33. El uso de la composición farmacéutica de acuerdo a lo expuesto en 27-29 para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales.
34. El uso de la composición farmacéutica de acuerdo a lo expuesto en 27-29 para el tratamiento de la bacteriemia.
35. El uso de la composición farmacéutica de acuerdo a lo expuesto en 27-29 para el tratamiento de osteomielitis.
36. El uso de la composición farmacéutica de acuerdo a lo expuesto en 27-29 para el tratamiento de pacientes con riesgo de desarrollar sepsis.
37. El uso de la composición farmacéutica de acuerdo a lo expuesto en 27-29 para métodos para el tratamiento de infecciones crónicas, artritis y afecciones reumáticas.



Lic. Mariela Vázquez Castillo
Representante Legal, CIGB

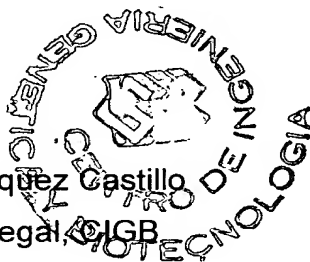


REFERENCIAS:

1. Wright, SD, Ramos, RA, Tobias, PS, Ulevitch, RJ, Mathison, JC (1990). CD14 serves as the cellular receptor for complexes of lipopolysaccharide with lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1431-33.
2. Pugin, J, Schurer-Maly, CC, Leturcq, D, Moriarty, A, Ulevitch, RJ, Tobias, PS (1993). LPS activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by LPS binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:2744-48.
3. Mathison, J.C., Wolfson, E. y Ulevitch, R.J. (1988). Participation of tumor necrosis in the mediation of Gram-negative bacteria lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J. Clin. Invest.* 81:1925-37
4. Weiss, J., Elsbach, P., Shu, C., Castillo, J., Grinna, L., Horwitz, A., Theofan, G. (1992). Human bactericidal/permeability increasing protein and a recombinant NH2-terminal fragment cause killing of serum-resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by bacteria. *J. Clin. Invest.* 90:1122-30
5. Little, R.G., Kelner, D.N., Lim, E., Burke, D.J., Conlon, P.J. (1994). Functional domains of recombinant bactericidal/permeability increasing protein. *J. Biolog. Chem.* 269(3):1865-72
6. Battafarano, R.J., Dahlberg, P.S., Ratz, C.A., Johnston, J.W., Gray, B.H., Haseman, J.R., Mayo, K.H., Dunn, D.L. (1995). Peptide derivatives of three distinct lipopolysaccharide binding proteins inhibit LPS-induced tumor necrosis factor-alpha secretion in vitro. *Surgery* 118:318-24.
7. Dahlberg, P.S., Acton, R.D., Battafarano, R.J., Uknis, M.E., Ratz, C.A., Johnston, J.W., Haseman, J.R., Gray, B.H., Dunn, D.L. (1996). A novel endotoxin antagonist attenuates tumor necrosis factor-alpha secretion. *J. Surg. Res.* 63:44-48
8. Uknis, M.E., Wasiluk, K.R., Acton, R.D., Klaerner, H.G., Dahlberg, P.S., Ilyina, E.E., Haseman, J.R., Gray, B.H., Mayo, K.H., Dunn, D.L. (1997). Design of a potent novel endotoxin antagonist. *Surgery* 122:380-5
9. Ried, C., Wahl, C., Miethke, T., Wellenhofer, G., Landgraf, C., Scheneider-Mergener, J., Hoess, A. (1996). High affinity endotoxin-binding and

- neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant *Limulus* anti-LPS factor. *J. Biol. Chem.* 271(45):28120-127.
10. Han, J., Ulevitch, R., Tobias, P. (1995). Polypeptides of lipopolysaccharide binding protein. WO 95/25117.
 11. Heavner, G.A., Taylor, A., Sgerris, D. (1994). Novel peptides useful for inhibiting binding of LPS by LPS-binding protein. WO 95/08560.
 12. Gazzano-Santoro, H., Theofan, G., Trown, P.W. (1995). Lipopolysaccharide binding protein derivatives. WO 95/00641.
 13. Hoess, A., Liddington, R.C. (1995). Lipopolysaccharide-binding and neutralizing peptides. WO 95/05393.
 14. Araña, M.J., China, G., Guerra, M. y Rodríguez, A. Péptidos derivados de la proteína que enlaza LPS, que neutralizan la activación celular mediada por LPS y mejoran las afecciones relacionadas con la endotoxina (1997). OCPI 128/97
 15. Hoess, A., Watson, S., Siber, G.R., Liddington, R. (1993). Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1.5Å resolution. *EMBO J.* 12(9):3351-56.
 16. Lamping, N., Hoess, A., Yu, B., Park, T.C., Kirschning, C.J., Pfeil, D., Reuter, D., Wright, S.D., Herrmann, F., Schumann, R.R. (1996). Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg94, Lys95, Lys99) of LPS-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J. Immunol.* 157:4648-56
 17. Merrifield, R. B. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 1963, 85:2149-2154


 Lic. Mariela Vázquez Castillo
 Representante Legal, CIGB





DECLARATION

I, Manuel Araña Rosáinz, translator, of CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA, Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, C. Habana 10600, Cuba, do solemnly and sincerely declare that I am conversant with the English and Spanish languages and am a competent translator thereof, and that the annexed document is, to the best of my knowledge and belief, a complete, true and correct translation of the Cuban Patent Application CU 1999/71 made in Cuba filed on 10 June, 1999.

Date: 26 May, 2000.

Signature: _____

ABSTRACT**ANALOGUES OF LIPOPOLYSACCHARIDE-BINDING PROTEIN (LBP)-DERIVED PEPTIDES THAT EFFICIENTLY NEUTRALIZE LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS).**

This invention relates to analogues of peptides from an LPS-binding protein (LBP), that were obtained by a.a. replacements at selected sites of the native sequence and which express vigorous inhibitory activity upon LPS-mediated cell activation, both *in vitro* and *in vivo*. These peptide analogues exhibit advantageous properties to ameliorate endotoxin-related disorders, specially the systemic inflammatory response syndrome. These peptide analogues are derived from an amphipatic domain with high density of positive charge amino acids. The present invention define the importance of certain peptide sequences to assure the optimum neutralizing activity and potency. These peptide analogues impaired LBP binding to LPS and inhibit human leukocyte cytokine production induced by LPS. Additionally, these peptides protect Actinomycin D-sensitized mice from lethal doses of LPS. This invention also includes the use of the inhibitory peptides and related molecules in the treatment of endotoxin-associated disorders, pharmaceutical compositions containing the peptide analogues and derivatives, diagnostic methods utilizing the peptides of the invention.

DESCRIPTION

ANALOGUES OF LIPOPOLYSACCHARIDE-BINDING PROTEIN (LBP)-DERIVED PEPTIDES THAT EFFICIENTLY NEUTRALIZE LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS).

The present invention relates generally to analogues of peptides from a LBP region whose primary sequence have been substituted at particular amino acid (a.a.) sites to obtain an effective binding to and neutralization of LPS; and specifically to the use of the peptides, and their derivatives, to prevent and treat sepsis and other endotoxin-related disorders.

Systemic inflammatory responses can be triggered by both infectious and not infectious disorders, such as severe trauma and pancreatitis. Sepsis include those manifestations related to the systemic response to infection, like tachycardia, tachypnea, chills, initial irregularly remittent fever followed by persistent fever, and leukocytosis, and those related to the organs dysfunction, such as cardiovascular, respiratory, renal, hepatic and hematological abnormalities. Sepsis is considered severe when it is associated with signs of hypoperfusion, like lactic acidosis, oliguria and altered mental status, with hypotension leading to shock, or with disseminated intravascular coagulation, adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure.

Toxins produced or released by diverse microorganisms initiates the sepsis pathogenic cascade. Although septic shock is often only associated with Gram-negative bacteremia, Gram-positive bacteria, fungi, viruses, protozoa, spirochetes, rickettsiae, and inclusive plants and venoms can produce septic shock syndromes. *E.coli* is the most commonly isolated Gram-negative pathogen in sepsis, followed by *Klebsiella-Enterobacter*, and other bacteria such as *Pseudomonas*, *Proteus* and *Serratia*. Also *Neisseria meningitidis* bacteremia is a frequent cause of septic shock. The process begins with the colonization by microorganisms of a tissue nidus. Then the organisms may invade bloodstream directly (bacteremia) or may proliferate locally and release toxic substances into the bloodstream (toxemia). Among these released substances, endotoxin, an structural component of gram-negative bacteria outer membrane is commonly associated with sepsis. Toxemia can even result from bacteria translocation through the impaired intestine wall.

Endotoxin or lipopolysaccharide (LPS) is an ubiquitous component in the external leaf of the outer membrane of all Gram-negative bacteria. LPS biological and pharmacological activities are quite similar regardless the particular microorganisms they were derived of, or the specific strain pathogenicity. Structural differences are observed in endotoxin derived from different gram-negative bacterial strains. The outermost part of the endotoxin molecule consists of a series of oligosaccharides that are structurally and antigenically diverse. Internal to this oligosaccharides are the core saccharides which are structurally rather similar in gram-negative bacteria. To the core oligosaccharide is bound a lipid moiety, lipid A, highly conserved structure that is responsible for most LPS toxicity and biological activities.

LPS triggers both humoral and cell activation mechanisms that have a primary pathogenic role in shock and organ failure. Various humoral pathways are activated by LPS including the complement, coagulation and kallikrein cascades, which are partially responsible for haemodynamic changes observed in sepsis. Nevertheless, interactions between LPS and cellular receptors in a variety of cell types play a pivotal role in the biological and toxic effects of LPS. Particularly cells of the monocyte/macrophage lineage are involved in the host primary response to endotoxin. Other implicated cell types are polymorphonuclear (PMN) leukocytes, lymphocytes and endothelial cells. Activation of these cell types by LPS is characterized by the rapid production and released of a series of products that constitute central endogenous mediators of sepsis, especially different cytokines such as TNF, IL-1 and IL-6.

The intravascular activation of inflammatory systems involved in septic shock, as the haemodynamic alterations, are mainly the consequence of a dysregulation in the production of these cytokines. One of them, TNF, is now regarded as a central mediator of the pathophysiological changes associated with LPS release. Therefore experimental approaches that inhibits TNF release induced by LPS are attractive as potential procedures to reduce sepsis morbidity and mortality.

LPS interacts with cellular receptors that are linked to signal pathways mediating cellular activation. CD14 is a membrane glycerolphosphorylinositol-anchored protein (mCD14) that is currently considered the major cellular receptor for LPS in myeloid cells¹. Another protein, LBP, promotes interaction between LPS and mCD14 to form

a high affinity complex. LBP enhances the binding of LPS to the membrane form of CD14, forming a ternary complex LBP: LPS: CD14. Recent reports showed that LBP remains associated with monocytes cell membranes when they are incubated with LPS. A soluble form of CD14 (sCD14) is also present in serum and it forms complexes with LPS that activates LPS-responsive cells lacking mCD14 such as endothelial, smooth muscle and epithelial cells². LBP plays a catalytic role in the formation of LPS:sCD14 complexes for binding to non-mCD14 bearing cells. Therefore LBP plays a critical function in LPS-mediated cell activation events observed in sepsis; molecules that have the ability to compete or inhibit LBP enhancing effects in LPS toxic functions, could contribute to ameliorate symptoms of sepsis.

During the last decade various agents that neutralize LPS effects have been described, and some of them are currently under preclinical or clinical development. Mortality induced by endotoxin administration was reduced in experimental animals pre-treated with anti-LPS antibodies³. Inasmuch as the N-terminal fragment of bactericidal/permeability increasing protein (BPI) keeps holoprotein's antiendotoxic and bactericidal properties⁴, this fragment have been used in preclinical, and recently in clinical trials to asses its effectiveness in the treatment of LPS-associated disorders such as meningococemia, hemorrhagic trauma and severe intra-abdominal infections.

BPI-derived peptides and their analogues have been evaluated as endotoxin antagonists⁵⁻⁸. Among other peptide agents that bind to and neutralize LPS are those derived from *Limulus* anti-LPS factor (LALF)⁹ and the synthetic antiendotoxin peptides mimicking polymyxin B structure.

The N-terminal fragment of LBP¹⁰, as well as other shorter peptides, including 17-45, 65-108 and 142-169 regions, or segments thereof^{6,11-14}, have been described as LPS binding regions and their neutralizing ability over LPS toxic effects have been demonstrated.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The present invention relates to analogues of peptide sequences derived from a LBP region, which result from substitutions within the primary structure of the native

protein, and have an improved ability to bind and neutralize LPS biological effects associated to its toxic properties. The above mentioned a.a. substitutions render peptides with advantageous properties when compare with previously described overlapping sequences^{6,10-14}.

To understand the molecular basis of LPS-protein interaction the a.a. sequence of LBP and BPI, proteins known to bind specifically LPS, were analyzed. The aim of the study was to detect features in the primary structure of these proteins that could be correlated with the ability to interact with LPS. The analysis included predictions of secondary structure and accessibility, sequence similarity searches, inspection of conserved residues and analysis of the distribution of charged residues along the sequence. Inspection of the alignment reveals that some linear clusters of basic residues are present in LBP and BPI. These moieties could favorably interact with acidic groups of the highly anionic LPS (Lipid A). The basic character of these regions was specific of BPI and LBP, but not of other proteins from the same family such as phospholipid transfer protein (PLTP) and cholesteryl ester transfer protein (CETP) which bind specifically phospholipids and cholesterol, respectively.

The analysis suggested that a potential LPS-binding site in LBP is located between residues 89 and 96 of the mature protein, considering a major cluster of basic residues in this region¹⁴. Other authors also proposed this, or overlapping sequences, as potential LPS-binding sites in LBP^{6,11-13,15}.

To corroborate this findings, synthetic peptides corresponding to this region, including or not selected substitutions in specific residues were designed, synthesized and tested; peptide sequences comprising this region from LBP, which have the ability to bind and neutralize LPS were previously described by us¹⁴.

This invention provides peptides whose sequences result from single or multiple a.a substitutions at selected sites of the series, regarding the native sequence, which optimize the neutralizing capacity of the analogues.

In a first embodiment the invention relates to peptides characterized by their ability to antagonize the LBP:LPS interaction and to inhibit the biological effects triggered by LPS. The peptides of this invention present essential a.a. at positions +1, +5, +6, +7, +9, +10, +11, +12 and +13, and other preferred a.a. in other positions within the described sequences, all necessary for the optimal display of the LPS-neutralizing

properties of the peptides. Herein "essential" a.a. are defined as those indispensable at said positions for displaying improved LPS-neutralizing properties.

In a preferred embodiment the present invention relates to peptides that bind to and efficaciously neutralize LPS, whose a.a. sequence is derived from the 86-99 a.a. region of the LBP mature protein (SEQ. ID NO.1) but with selected substitutions at particular sites within this domain.

Preferred peptides of the present invention are those with the a.a. sequence X-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-Y, wherein:

X is a linear chain from zero to four D- or L-amino acids.

(1) is one of the D- or L-a.a. alanine, threonine, glutamine, asparagine or serine, and if and only if at least one of the a.a. at positions +5, +9, +10, +11 or +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (1) could also be arginine or lysine.

(2) is one of the D- or L-a.a. alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, methionine, tryptophan or tyrosine.

(3) is one of the D- or L-a.a. glutamine, asparagine, serine or threonine.

(4) is one of the D- or L-a.a. glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, methionine, tryptophan or tyrosine.

(5) is one of the D- or L-a.a. alanine, threonine, glutamine, asparagine or serine, and if and only if at least one of the a.a. at positions +1, +9, +10, +11 or +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (5) could also be arginine or lysine.

(6) is one of the D- or L-a.a. tryptophan or phenylalanine.

(7) is one of the D- or L-a.a. lysine or arginine.

(8) is one of the D- or L-a.a. alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine or tyrosine.

(9) is one of the D- or L-a.a. alanine, threonine, glutamine, asparagine or serine, and if and only if at least one of the a.a. at positions +1, +5, +10, +11 or +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (9) could also be arginine or lysine.

(10) is one of the D- or L-a.a. alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, methionine, tryptophan or tyrosine, and if and only if at least one of the a.a. at

positions +1, +5, +9, +11 ó +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (10) could also be lysine or arginine.

(11) is one of the D- or L-a.a. alanine or valine; and if and only if at least one of the a.a. at positions +1, +5, +9, +10, o +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (11) could also be serine; and if and only if the a.a. at position +10 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (11) could also be threonine, glutamine, asparagine, lysine or arginine.

(12) is one of the D- or L-a.a. phenylalanine, tryptophan or tyrosine.

(13) is one of the D- or L-a.a. alanine, threonine, glutamine, asparagine or serine; and if and only if at least one of the a.a. at positions +1, +5, +9, +10 ó +11 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (13) could also be phenylalanine, arginine or lysine; and if and only if the a.a at position +14 is lysine or arginine, then (13) could also be glycine.

(14) is one of the D- or L-a.a. lysine, arginine or alanine, and if and only if the a.a. at position +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (14) could also be valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, methionine, tryptophan or tyrosine.

Y is a linear chain from zero to four D- or L-amino acids.

Representative examples of specifically preferred peptides of the present invention include sequences ID no. 2 to 63.

Tests indicate that peptides having the above described sequences show advantageous properties when compared with peptides having other a.a. at the selected sites, or that are substituted at these positions without considering the definitions of the present invention.

Specifically, peptides with the above described sequences have advantageous properties respect to peptides with sequences corresponding to the native LBP protein, including this region or segments thereof.

The functional superiority of the peptides of the present invention respect to previously described peptides¹⁰⁻¹⁴ is based in these single substitutions, and their combinations. These previous reports described peptides derived from LBP with LPS-binding and –neutralizing properties, which could include partially or totally the

herein selected sequence, but maintaining the LBP native primary sequence or do not involving the essential single or combined substitutions described in the present invention. The neutralizing potency of the peptides described in previous studies, which do not include the essential substitutions as defined in this invention, is various times lower than the potency of the peptides of the present invention. In addition, peptides that are substituted, in regard to the LBP primary sequence, as defined in SEQ ID No. 64, 65 and 66, or have other a.a different to those defined at the present invention for positions +6, +7 and +12 lack of relevant LPS-neutralizing capacity.

Substitutions at the other positions (+1, +5, +9, +10, +11 y +13), as described in the present invention and how illustrate preferred peptides (SEQ ID No. 2 to 63), increased considerably and unexpectedly the peptide ability to block LPS:LBP interaction, and enhanced the inhibitory effect upon LPS-mediated activation of inflammatory cells.

This unexpected quality exhibited by the peptide analogues of the invention differs from the effect of some of these same substitutions within the holoprotein, as described by others¹⁶. This fact remarks the distinction between the interaction of the peptides of the invention and LPS, and that of LBP, or even its functional N-terminal fragment.

This invention also relates to peptide analogues whit the described sequences which are constrain to adopt a cyclic conformation by means of a disulfide bond formed between two cysteine residues added to their N- and C-terminus respectively, or through an amide bond formed between the side chains of constituting amino acids.

It is further contemplated in this invention that those skill in the art are able to replace particular amino acid residues by non-natural homologous amino acids maintaining the LPS-neutralizing properties of the whole molecule, as well as to change the main chain backbone by backbone-mimetic organic compounds.

In another embodiment this invention relates to larger polypeptides bearing the above described preferred sequences at their N- or C-terminus in such a way that maintains the ability to bind and neutralize LPS and confers this ability to the hybrid polypeptide. A preferred hybrid polypeptide comprises a fusion of any of the preferred peptides and light or heavy chain regions of immunoglobulins (Ig).

This invention also relates to scaffold proteins that appropriately exposed one of the preferred peptide sequences in such a way that maintains or enhances their ability to bind and neutralize LPS and confers this ability to the hybrid polypeptide. The term "scaffold proteins" as herein used refers to hybrid polypeptides that include within their polypeptide chain one or more of the selected sequences in such a way that the inserted segment forms an exposed loop in the structure of the fused protein or polypeptide.

Also this invention relates to two or more repeats of one of the preferred polypeptide sequences in a linear polypeptide chain, or the combination of two or more of them, in such a way that these sequences are connected by linkers, and the novel polypeptide have the ability to bind and efficiently neutralize LPS. Preferred linkers are those having between 12 and 25 amino acid residues and are rich in the glycine, alanine, proline or serine residues. Likewise the present invention applies to arrangements of three or more copies of the preferred peptide sequences linked by their C-terminus to a lysine core, forming structures that have the ability to bind and efficaciously neutralize LPS. Other arrangements of preferred sequences could result from the combination of the aforementioned cyclic peptides.

Synthetic peptides having the described preferred sequences are small molecules with broader utility than larger polypeptides. Particularly, the peptides of the present invention will have some advantages over larger polypeptides because of their lower immunogenicity and broader spectrum of LPS-neutralizing activity, concerning diverse Gram-negative strains including those with long polysaccharide chains of tightly packed LPS in the envelope, such as *Proteus mirabilis*. *In vivo* half-life and other pharmacological parameters of the peptides could be improved with hybrid and scaffold polypeptides and proteins bearing the preferred sequences.

All the peptides encompassed by the present invention can be prepared using standard procedures of peptide synthesis, including for example the solid-phase synthetic technique describe by Merrifield¹⁷, as well as other apparent to anyone skilled in the art.

In a further preferred embodiment this invention provides pharmaceutical compositions comprising pharmaceutically appropriated diluents, carriers or adjuvants, and effective quantities of one or more of the peptides, or hybrid or

scaffold proteins containing their sequences. The term “effective quantity” as herein used refers to the amount of the peptides, or hybrid or scaffold proteins, that is sufficient to ameliorate symptoms associated with systemic responses to LPS.

The novel pharmaceutical compositions can be useful for methods to treat various disorders associated with the release of LPS, specially the infection with Gram-negative bacteria and its sequelae: endotoxemia and shock, Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome (CARS), disseminated intravascular coagulation, Adult Respiratory Distress Syndrome and Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS). The therapeutic method is provided to ameliorate one or more symptoms of patients suffering or at risk for developing disorders caused by diverse insults such as infection, trauma, burns and pancreatitis. Patients who also may require such a treatment include those afflicted from inflammatory bowel diseases and obstructive jaundice or other disorders where gastrointestinal permeability is impaired and bacterial translocation or endotoxin leakage occur.

Also DNA sequences encoding the peptides, or encoding hybrid or scaffold proteins containing the peptide sequences could be inserted in proper vectors to be expressed *in vivo* for therapeutic purposes along with appropriated carriers, diluents, adjuvants or stabilizing solutions or chemicals.

EXAMPLES

EXAMPLE 1.

This example describes the capacity of preferred peptides of the invention to block the interaction between LBP and *E.coli* LPS. An ELISA was used to determine the binding of biotinylated-LPS to surface-captured human LBP, in the presence or absence of fixed quantities of the selected peptides. LPS was biotinylated according to standard procedures. Human LBP (hLBP) was captured by using a specific monoclonal antibody, purified by affinity chromatography. Mixtures of LPS and each peptide were incubated during 2 h at room temperature, and then 100 μ L were added to hLBP-containing wells. The binding of biotinylated-LPS to hLBP was detected with horseradish peroxidase-conjugated streptavidin. The assay was developed by adding a chromogenic substrate. Figure 1 shows the results of this assay when biotinylated-LPS was incubated with peptides LBP₈₆₋₉₉ (LBP), LBP_{A86}, LBP_{A90} and LBP_{A94}. Figure 2 shows results for peptides LBP_{A95}, LBP_{A96} and LBP_{A98}, and Figure 3 represents the results for peptides LBP_{A91}, LBP_{A92} and LBP_{A97}. Each experiment recorded the interaction of hLBP and biotinylated-LPS in absence of peptides, in presence of LBP₈₆₋₉₉, and in the example presented in Fig. 2 the effect of a non-related cationic peptide (C5,3).

The interaction between hLBP and *E.coli* LPS was notably impaired by peptides of this invention, as represented by LBP_{A86}, LBP_{A90}, LBP_{A94}, LBP_{A95}, LBP_{A96} and LBP_{A98}, and it was not affected by peptides LBP_{A91}, LBP_{A92} and LBP_{A97}.

These results demonstrate that peptides with sequences defined as specially preferred in this invention have higher blocking capacity of LBP:LPS interaction than the LBP₈₆₋₉₉, that has the native sequence of this region in human LBP. This example confirms that the a.a. substitutions described in the present invention for peptide sequences derived from this particular region of hLBP are essential to obtain peptide analogues that efficaciously block the interaction between hLBP and LPS. Likewise, this example demonstrates that replacements at particular sites of the series, by different a.a. to those described in this invention, reduce or abrogate the LPS-neutralizing activity of peptides derived from the mentioned hLBP region.

EXAMPLE 2.

In order to determine if the peptides of the present invention were able to neutralize LPS-mediated responses, their ability to reduce the release of TNF by LPS-activated human peripheral blood cells was estimated. This assay evaluates the release of TNF by LPS-induced human peripheral blood mononuclear cells (PBMC), using concentrations of LPS commonly found in septic patients. LPS was incubated with fixed concentrations of each peptide during 2 h at 37°C and the mixtures were then added to PBMC. The culture medium was supplemented with human LBP (200 ng/mL) and plates were incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. TNF α was measured in culture supernatants after 18-24 h using a human TNF- α specific ELISA. Figure 4 represents the average results from three different experiments. Reduced levels of cytokine release were observed in cultures containing *E.coli* 0111:B4 LPS and one of the following peptides: LBP₈₆₋₉₉, LBP_{A94}, LBP_{A95} and LBP_{A98}. The last three peptides exhibited higher inhibition than LBP₈₆₋₉₉ (LBP). Similar results were observed when other concentrations of LPS (2 or 10 ng/mL) and hLBP (20 or 100 ng/mL) were used. The non-related, cationic peptide B6,1 did not modify, as expected, the release of TNF in this assay. On the other hand the LBP_{A91} peptide, which has tryptophan residue at position (6) replaced with alanine, did not inhibit LPS-stimulated TNF production.

These results demonstrate that the peptides derived from this region of hLBP should have the specified sequences of this invention for displaying vigorous inhibitory activity upon LPS-mediated activation of human mononuclear cells. Likewise, the results suggest the usefulness of the peptides of the present invention for developing prophylactic and therapeutic methods for sepsis, systemic inflammatory response syndrome and other related disorders. The potency of the preferred peptides of this invention is properly demonstrated in this example, where endotoxin concentrations commonly found in endotoxemic patients were used.

EXAMPLE 3

This invention provides peptides with advantageous functions over other LBP-derived peptides that have the native sequence or different a.a. replacements to those herein described at positions +1, +5, +6, +7, +9, +10, +11, +12 and +13.

Among these others are some peptides previously described by their ability to reduce LPS biological effects¹¹⁻¹⁴. In order to demonstrate the advantage of the preferred peptides of this invention over these previously described peptides, their antagonist activity upon LPS-induced responses was compared; the effect of these different peptides on the LPS-induced IL-6 production in cultures of human PBMC is illustrated in Fig.5. The experimental procedure was similar to that one described in EXAMPLE 2. IL-6 was measured in culture supernatants after 18 h using a human IL-6 specific ELISA. In the represented experiment, the following peptides were evaluated: LBP₈₆₋₉₉, LBP-H (LBP₈₈₋₁₀₁, SEQ ID No.67)¹³, LBP_{A94}, LBP_{A95} and LBP_{A98}. IL-6 production was inhibited more than 35% only by LBP_{A94}, LBP_{A95} and LBP_{A98}, which have essential a.a., as defined in the present invention, at positions +9, +10, and +13 respectively. LBP_{A95} reduced the LPS-triggered response more than 70%, at every hLBP concentrations tested. This example remarks the capacity of the peptides of this invention to reduce the production of pro-inflammatory cytokines by LPS-stimulated cells.

EXAMPLE 4

An endotoxin shock animal model was used to determine if the peptides of this invention were able to block complex physiological responses triggered by LPS. In this model mice were sensitized with Actinomycin D to increase LPS-mediated toxic responses. With this purpose, Actinomycin D (7.5 µg) was administered i.p. to 6 to 8 weeks-old female mice. Simultaneously each mice received LPS, and survival was evaluated every 24 h during 120 h.

The effect of peptides of the present invention on mice survival was assessed by administering *E.coli* LPS (1 µg/mouse in saline vehicle) or LPS:peptide mixtures (previously incubated during 1 h at 37°C) to BALB/c sensitized mice. Figure 6 represents the results of a representative experiment where the following peptides were each administered at equimolar doses to groups of 20 mice: LBP₈₆₋₉₉, LBP_{A94}, LBP_{A95}, LBP_{A98} or B6,1 (cationic, non-related peptide). Mice survival was only significantly increased by LBP_{A94}, LBP_{A95} or LBP_{A98} (*p< 0.05 vs. vehicle or B6,1). The peptide LBP₈₆₋₉₉ increase survival only marginally. This example demonstrates the higher efficacy of preferred peptides of this invention in protecting mice from LPS

lethal inocula. The aforementioned *in vivo* neutralizing property of the peptides of the invention is relevant for their application in prophylactic or therapeutic methods for sepsis and other associated disorders.

Thus the above-mentioned results indicate that peptides of this invention retain their LPS-blocking properties when tested under patho-physiological conditions, demonstrating their pharmacological potency.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS.

ANALOGUES OF LIPOPOLYSACCHARIDE-BINDING PROTEIN (LBP)-DERIVED PEPTIDES THAT EFFICIENTLY NEUTRALIZE LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS).

Figure 1 shows the inhibition of the interaction between *E.coli* LPS and hLBP by preferred peptides of the present invention (LBP_{A86}, LBP_{A90} and LBP_{A94}). Human LBP was captured to the plates using a specific monoclonal antibody. Binding of biotinylated-LPS was detected with an streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. The extent to which the peptide LBP₈₆₋₉₉ (LBP) inhibits this interaction is also shown.

Figure 2 shows the inhibition of the interaction between *E.coli* LPS and hLBP by preferred peptides of the present invention (LBP_{A95}, LBP_{A96} and LBP_{A98}). The experimental conditions were similar to those described in Fig.1. The effect of a non-related cationic peptide, C5,3 is also included.

Figure 3 shows the effect on the interaction of hLBP and *E.coli* LPS of peptides that have distinct residues at positions +6, +7 or +12 to those described in this invention (LBP_{A91}, LBP_{A92} and LBP_{A97}). The experimental conditions were similar to those described in Fig.1.

Figure 4 shows the inhibition by peptides of the present invention (LBP_{A94}, LBP_{A95} and LBP_{A98}) of the LPS-mediated release of TNF by human PBMC. The effects on this assay of LBP₈₆₋₉₉ (LBP), LBP_{A91}, B6,1 and polymyxin B (PMB) are also shown.

Figure 5 shows the inhibition by peptides of the present invention (LBP_{A94}, LBP_{A95} and LBP_{A98}) of the LPS-mediated release of IL-6 by human PBMC. Results are expressed as % inhibition of IL-6 release compared with the cytokine production in the absence of peptides. The effects on this assay of LBP₈₆₋₉₉ (LBP), LBP-H and B6,1 are also shown.

Figure 6 shows survival data of groups of 20 mice each challenged with *E.coli* LPS i.p. and simultaneously treated with equimolar amounts of different peptides of the present invention. Survival in groups of BALB/c mice treated with LBP₈₆₋₉₉ (LBP) and B6,1 is also shown. Mice survival was recorded each 24 h during 120 h.

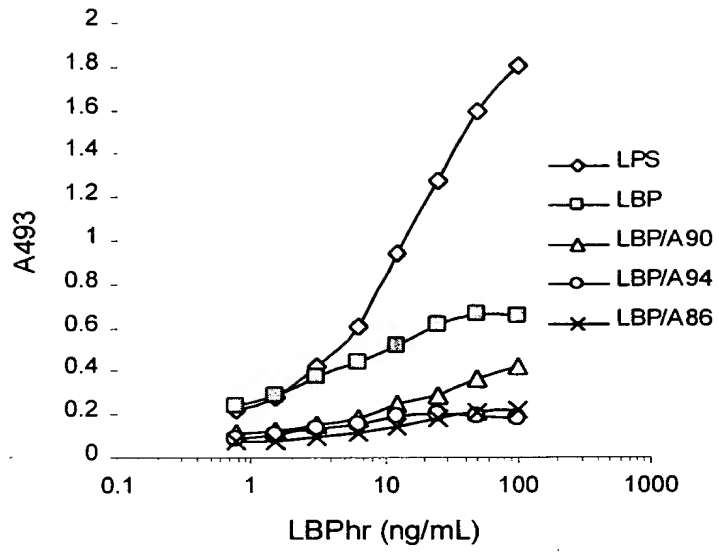


Fig. 1

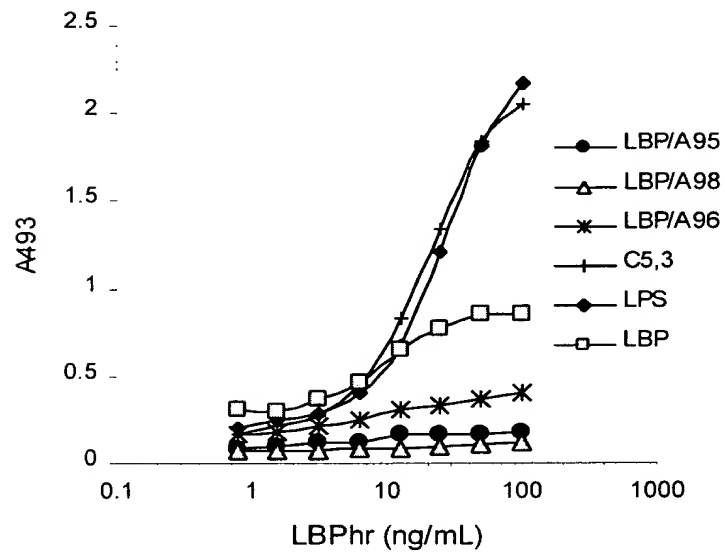


Fig. 2

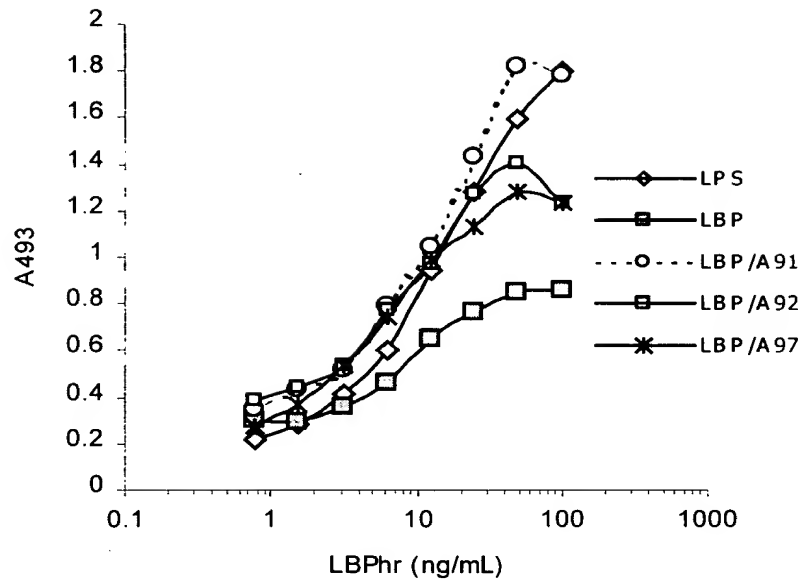


Fig. 3

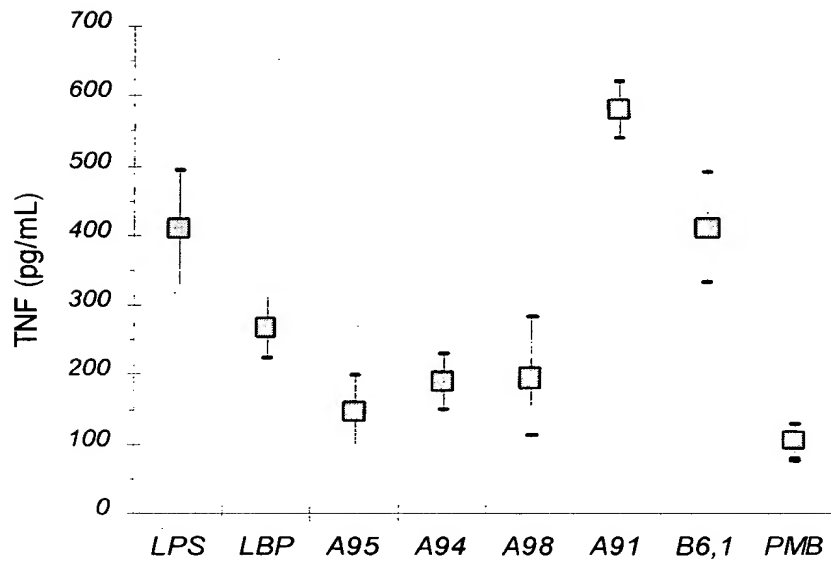


Fig.4

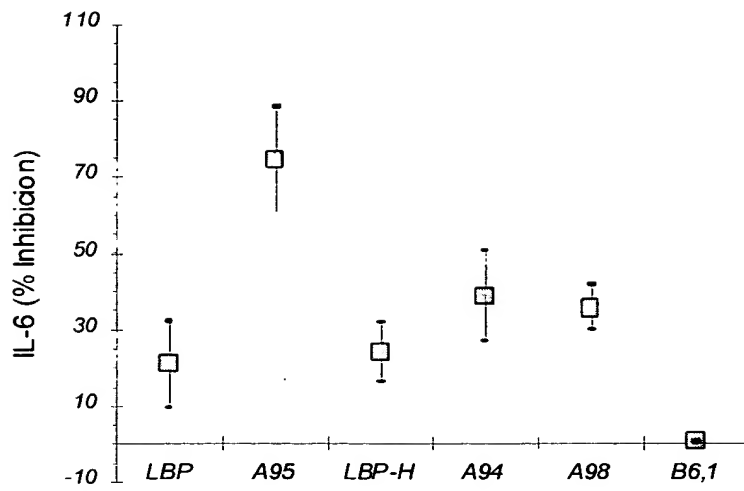


Fig. 5

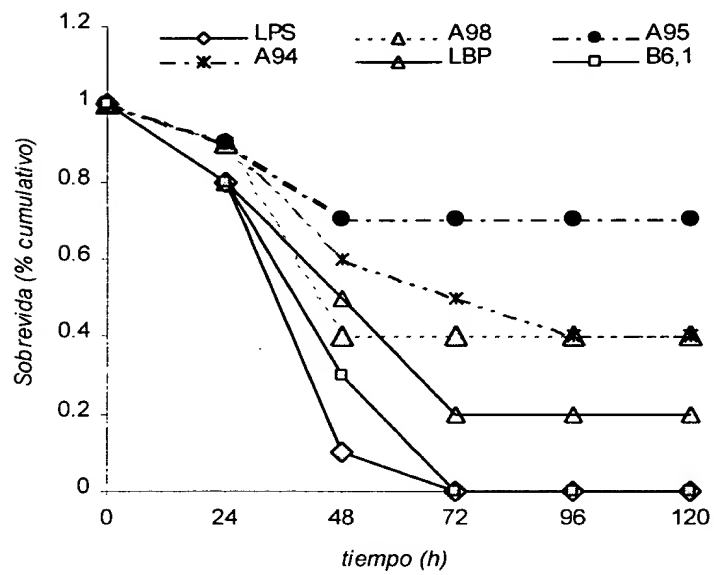


Fig. 6

SEQUENCE LISTING

NUMBER OF SEQUENCES: 67

(1) INFORMATION FOR SEQ ID NO.1 (LBP₈₆₋₉₉)

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. SOURCE: human Lipopolysaccharide Binding Protein (hLBP)
 - e. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRKSFFK

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO.2 (LBP_{A86})

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWKVRKSFFK

(3) INFORMATION FOR SEQ ID NO.3 (LBP_{A90})

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGAWKVRKSFFK

(4) INFORMATION FOR SEQ ID NO.4 (LBP_{A94})

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVAKSFFK

(5) INFORMATION FOR SEQ ID NO.5 (LBP_{A95})

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRASFFK

(6) INFORMATION FOR SEQ ID NO.6 (LBP_{A96})

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRKAFFK

(7) INFORMATION FOR SEQ ID NO.7 (LBP_{A98})

- a. TYPE: amino acid

- b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRKSEFAK

(8) INFORMATION FOR SEQ ID NO.8

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWKVRKSEFAK

(9) INFORMATION FOR SEQ ID NO.9

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWKVRASFFK

(10) INFORMATION FOR SEQ ID NO.10

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGAWKVRKSFFK

(11) INFORMATION FOR SEQ ID NO.11

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWKVAKSFFK

(12) INFORMATION FOR SEQ ID NO.12

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWKVRKAFFK

(13) INFORMATION FOR SEQ ID NO.13

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGAWKVAKSFFK

(14) INFORMATION FOR SEQ ID NO.14

- a. TYPE: amino acid

- b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGAWKVRASFEK

(15) INFORMATION FOR SEQ ID NO.15

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGWKVRKSEFEK

(16) INFORMATION FOR SEQ ID NO.16

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGAWKVRKSFAA

(17) INFORMATION FOR SEQ ID NO.17

- e. TYPE: amino acid
 - f. LENGTH: 14 amino acids
 - g. MOLECULE TYPE: peptide
 - h. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVAKAEFEK

(18) INFORMATION FOR SEQ ID NO.18

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVAKSFAK

(19) INFORMATION FOR SEQ ID NO.19

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRKAFKAFK

(20) INFORMATION FOR SEQ ID NO.20

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRASFAK

(21) INFORMATION FOR SEQ ID NO.21

- a. TYPE: amino acid

- b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RFQGRWKVRASFFK

(22) INFORMATION FOR SEQ ID NO.22

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVSGRWKVRASFFK

(23) INFORMATION FOR SEQ ID NO.23

- e. TYPE: amino acid
 - f. LENGTH: 14 amino acids
 - g. MOLECULE TYPE: peptide
 - h. TOPOLOGY: linear
- RVNGRWKVRASFFK

(24) INFORMATION FOR SEQ ID NO.24

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQMRWKVRASFFK

(25) INFORMATION FOR SEQ ID NO.25

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQFRWKVRASFFK

(26) INFORMATION FOR SEQ ID NO.26

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKFRASFFK

(27) INFORMATION FOR SEQ ID NO.27

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRAQFFK

(28) INFORMATION FOR SEQ ID NO.28

- a. TYPE: amino acid

- b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRASWFK

(29) INFORMATION FOR SEQ ID NO.29

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRASFFA

(30) INFORMATION FOR SEQ ID NO.30

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRASFQV

(30) INFORMATION FOR SEQ ID NO.30

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRASFQV

(31) INFORMATION FOR SEQ ID NO.31

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVSGRWKVRASFAK

(32) INFORMATION FOR SEQ ID NO.32

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVSGRWKVRASFQV

(33) INFORMATION FOR SEQ ID NO.33

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWKVRASFTV

(34) INFORMATION FOR SEQ ID NO.34

- a. TYPE: amino acid

- b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRVSFFK

(35) INFORMATION FOR SEQ ID NO.35

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWKVRVSFFK

(36) INFORMATION FOR SEQ ID NO.36

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVSGRWKVRVSFFK

(37) INFORMATION FOR SEQ ID NO.37

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRVSFAK

(38) INFORMATION FOR SEQ ID NO.38

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRVSFQV

(39) INFORMATION FOR SEQ ID NO.39

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRVTFFK

(40) INFORMATION FOR SEQ ID NO.40

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWRVRVKFTV

(41) INFORMATION FOR SEQ ID NO.41

- a. TYPE: amino acid

- b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWRVRVAFK

(42) INFORMATION FOR SEQ ID NO.42

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWRVRVSFAK

(43) INFORMATION FOR SEQ ID NO.43

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWRVRVSFQV

(44) INFORMATION FOR SEQ ID NO.44

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVSGRWRVRVSFAK

(45) INFORMATION FOR SEQ ID NO.45

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVSGRWRVRVSFQV

(46) INFORMATION FOR SEQ ID NO.46

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWRVRVTFQV

(47) INFORMATION FOR SEQ ID NO.47

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVSGRWRVRVTFK

(48) INFORMATION FOR SEQ ID NO.48

- a. TYPE: amino acid

- b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVSGRWRVRVTFQV

(49) INFORMATION FOR SEQ ID NO.49

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWRVAKSFQV

(50) INFORMATION FOR SEQ ID NO.50

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWRVAKSFGK

(51) INFORMATION FOR SEQ ID NO.51

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGRWRVAKSFQV

(52) INFORMATION FOR SEQ ID NO.52

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVSGRWRVAKAFGK

(53) INFORMATION FOR SEQ ID NO.53

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVSGRWRVAKAFQV

(54) INFORMATION FOR SEQ ID NO.54

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVSGRWRVKVAFQV

(55) INFORMATION FOR SEQ ID NO.55

- a. TYPE: amino acid

- b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGAWKVRASFAK

(56) INFORMATION FOR SEQ ID NO.56

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGAWKVRASFQV

(57) INFORMATION FOR SEQ ID NO.57

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGAWKVRASFAK

(58) INFORMATION FOR SEQ ID NO.58

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- AVQGAWKVRASFQV

(59) INFORMATION FOR SEQ ID NO.59

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 18 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- TIRVQGRWKVRASFFKLQ

(60) INFORMATION FOR SEQ ID NO.60

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 18 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- TVRVQGAWKVRASFFKLQ

(61) INFORMATION FOR SEQ ID NO.61

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 18 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- TVRVQGRWKVRASFAKLQ

(62) INFORMATION FOR SEQ ID NO.62

- a. TYPE: amino acid

- b. LENGTH: 17 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- SVRVQGRWKVRASFAVT

(63) INFORMATION FOR SEQ ID NO.63

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 24 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- CRVQGAWKVRKSFFKLQGSFVDSC

(64) INFORMATION FOR SEQ ID NO.64 (LBP_{A92})

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWAVRKSEFFK

(65) INFORMATION FOR SEQ ID NO.65 (LBP_{A97})

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- RVQGRWKVRKSAFK

(66) INFORMATION FOR SEQ ID NO.66 (LBP_{A91})

- a. TYPE: amino acid
- b. LENGTH: 14 amino acids
- c. MOLECULE TYPE: peptide
- d. TOPOLOGY: linear

RVQGRAKVRKSFFK

(67) INFORMATION FOR SEQ ID NO.67 (LBP₈₈₋₁₀₁)

- a. TYPE: amino acid
 - b. LENGTH: 14 amino acids
 - c. MOLECULE TYPE: peptide
 - d. TOPOLOGY: linear
- QGRWKVRKSFFKLQ

CLAIMS

ANALOGUES OF LIPOPOLYSACCHARIDE-BINDING PROTEIN (LBP)-DERIVED PEPTIDES THAT EFFICIENTLY NEUTRALIZE LIPOPOLYSACCHARIDES (LPS).

1. A peptide derived from LBP but with essential substitutions in the primary structure respect to the native sequence, which has effective LPS-binding and neutralizing activity and is featured as follows:

(a) it comprises the amino acid sequence X-1-2-3-4-5-6-7-8-9-10-11-12-13-14-Y, wherein:

X is a linear chain from zero to four D- or L-amino acids.

(1) is one of the D- or L-amino acids alanine, threonine, glutamine, asparagine or serine; and if and only if at least one of the a.a. at positions +5, +9, +10, +11 or +13 has been replaced from the native LBP sequence according to what is herein described, then (1) could also be arginine or lysine.

(2) is one of the D- or L-amino acids alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, methionine, tryptophan or tyrosine.

(3) is one of the D- or L-amino acids glutamine, asparagine, serine or threonine.

(4) is one of the D- or L-amino acids glycine, alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, methionine, tryptophan or tyrosine.

(5) is one of the D- or L-amino acids alanine, threonine, glutamine, asparagine or serine; and if and only if at least one of the a.a. at positions +1, +9, +10, +11 or +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (5) could also be arginine or lysine.

(6) is one of the D- or L-amino acids tryptophan or phenylalanine.

(7) is one of the D- or L-amino acids lysine or arginine.

(8) is one of the D- or L-amino acids alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine or tyrosine.

(9) is one of the D- or L-amino acids alanine, threonine, glutamine, asparagine or serine; and if and only if at least one of the a.a. at positions +1, +5, +10, +11 or +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (9) could also be arginine or lysine.

(10) is one of the D- or L-amino acids alanine, valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, methionine, tryptophan or tyrosine; and if and only if at least one of the a.a. at positions +1, +5, +9, +11 ó +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (10) could also be lysine or arginine.

(11) is one of the D- or L-amino acids alanine or valine; and if and only if at least one of the a.a. at positions +1, +5, +9, +10, o +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (11) could also be serine; and if and only if the a.a. at position +10 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (11) could also be threonine, glutamine, asparagine, lysine or arginine.

(12) is one of the D- or L-amino acids phenylalanine, tryptophan or tyrosine.

(13) is one of the D- or L-amino acids alanine, threonine, glutamine, asparagine or serine; and if and only if at least one of the a.a. at positions +1, +5, +9, +10 ó +11 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (13) could also be phenylalanine, arginine or lysine; and if and only if the a.a at position +14 is lysine or arginine, then (13) could also be glycine.

(14) is one of the D- or L-amino acids lysine, arginine or alanine, and if and only if the a.a. at position +13 has been replaced from the native sequence according to what is herein described, then (14) could also be valine, isoleucine, leucine, phenylalanine, methionine, tryptophan or tyrosine.

Y is a linear chain from zero to four D- or L-amino acids.

(b) it has essential a.a. residues at positions +1, +5, +6, +7, +9, +10, +11, +12 and +13, and other preferred as above described in the other positions.

2. A peptide according to claim 1 having the ability to bind and neutralize LPS which is the N-terminal region of a larger polypeptide.
3. A peptide according to claim 1 having the ability to bind and neutralize LPS which is the C-terminal region of a larger polypeptide.
4. A peptide according to claim 1 having the ability to bind and neutralize LPS which is inserted into the linear chain of a larger polypeptide.

5. A peptide according to claim 1 wherein at least one amino acid of said sequence has been substituted by a non-natural homologous amino acid.
6. A peptide according to claim 1 wherein the N-terminus has been modified by acetylation or succinylation.
7. A polypeptide according to claim 2 wherein the N-terminus has been modified by acetylation or succinylation.
8. A peptide according to anyone of claims 1 or 3 wherein the C-terminus is a -OH, -COOH or -CONH₂ group.
9. A peptide according to claim 1 that has been constrained to adopt a cyclic conformation by an intramolecular disulfide or amide bond.
10. A peptide according to claim 5 that has been constrained to adopt a cyclic conformation by an intramolecular disulfide or amide bond.
11. A peptide according to claim 1 wherein the chain backbone has been substituted by backbone-mimetic organic entities.
12. A peptide according to anyone of claims 5, 6, 9 or 10 wherein the chain backbone has been substituted by backbone-mimetic organic entities.
13. A peptide according to anyone of claims 1, 5, 6, 9 or 10 wherein at least one amino acid of said sequences has been substituted by alkylation using chemical or enzymatic methods.
14. A peptide according to anyone of claims 1, 5, 6, 9 or 10 wherein at least one amino acid of the said sequences has been glycosylated using chemical or enzymatic methods.
15. A peptide according to anyone of claims 2, 3 or 4 wherein at least one amino acid of the sequence of claim 1 has been glycosylated using chemical or enzymatic methods
16. A linear polypeptide chain containing two or more repeats of a peptide sequence according to anyone of claims 1 or 5 connected by 12-25 amino acid linkers, rich in glycine, alanine, proline or serine residues.
17. A linear polypeptide chain containing combinations of two or more peptide sequence according to claims 1 or 5 connected by 12-25 amino acid linkers, rich in glycine, alanine, proline or serine residues

18. An arrangement of three or more copies of homologous peptide sequences or combinations of different sequences, according to anyone of claims 1 or 5, linked by their C-terminus to a lysine core structure.
19. A peptide according to anyone of claims 1, 5, 6, 8 to 12 or 16 to 18 which is labeled with biotin, radioisotopes, enzymes, colloidal metals, or fluorescent, chemiluminescent or phosphorescent compounds.
20. A recombinant vector containing a DNA sequence encoding a peptide according to claim 1.
21. A recombinant vector containing a DNA sequence encoding a polypeptide according to anyone of claims 2 to 4.
22. A microorganism bearing a recombinant vector according to anyone of claims 20 or 21 and expressing said peptide encoded thereby.
23. A recombinant vector containing a DNA sequence encoding a peptide according to claim 1 and expressing said peptide encoded thereby after *in vitro* transfection of mammalian cells.
24. A recombinant vector containing a DNA sequence encoding a peptide according to claim 1 and expressing said peptide encoded thereby after *in vivo* administration.
25. A recombinant vector containing a DNA sequence encoding a peptide according to anyone of claims 2 to 4 and expressing said polypeptide encoded thereby after *in vitro* transfection of mammalian cells.
26. A recombinant vector containing a DNA sequence encoding a peptide according to anyone of claims 2 to 4 and expressing said polypeptide encoded thereby after *in vivo* administration.
27. A pharmaceutical composition comprising effective amounts of a peptide according to claim 1, and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier or adjuvant.
28. A pharmaceutical composition comprising effective amounts of a molecule according to anyone of claims 2 to 18, and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier or adjuvant.
29. A pharmaceutical composition according to anyone of claims 27 or 28, and including a pharmaceutically acceptable detergent.

30. The use of the pharmaceutical composition according to anyone of claims 27 to 29 for the treatment of Systemic Inflammatory Response Syndrome.
31. The use of the pharmaceutical composition according to anyone of claims 27 to 29 for the treatment of Gram-negative sepsis and its sequelae.
32. The use of the pharmaceutical composition according to anyone of claims 27 to 29 for the treatment of obstructive jaundice.
33. The use of the pharmaceutical composition according anyone of claims 27 to 29 for the treatment of inflammatory bowel diseases.
34. The use of the pharmaceutical composition according to anyone of claims 27 to 29 for the treatment of bacteremia.
35. The use of the pharmaceutical composition according to anyone of claims 27 to 29 for the treatment of osteomyelitis.
36. The use of the pharmaceutical composition according to anyone of claims 27 to 29 for the treatment of patients at risk of developing sepsis.
37. The use of the pharmaceutical composition according to anyone of claims 27 to 29 for methods to treat chronic infections, arthritis or rheumatic disorders.

REFERENCIAS:

1. Wright, SD, Ramos, RA, Tobias, PS, Ulevitch, RJ, Mathison, JC (1990). CD14 serves as the cellular receptor for complexes of lipopolysaccharide with lipopolysaccharide binding protein. *Science* 249:1431-33.
2. Pugin, J, Schurer-Maly, CC, Leturcq, D, Moriarty, A, Ulevitch, RJ, Tobias, PS (1993). LPS activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by LPS binding protein and soluble CD14. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 90:2744-48.
3. Mathison, J.C., Wolfson, E. y Ulevitch, R.J. (1988). Participation of tumor necrosis in the mediation of Gram-negative bacteria lipopolysaccharide-induced injury in rabbits. *J. Clin. Invest.* 81:1925-37
4. Weiss, J., Elsbach, P., Shu, C., Castillo, J., Grinna, L., Horwitz, A., Theofan, G. (1992). Human bactericidal/permeability increasing protein and a recombinant NH₂-terminal fragment cause killing of serum-resistant gram-negative bacteria in whole blood and inhibit tumor necrosis factor release induced by bacteria. *J. Clin. Invest.* 90:1122-30
5. Little, R.G., Kelner, D.N., Lim, E., Burke, D.J., Conlon, P.J. (1994). Functional domains of recombinant bactericidal/permeability increasing protein. *J. Biol. Chem.* 269(3):1865-72
6. Battafarano, R.J., Dahlberg, P.S., Ratz, C.A., Johnston, J.W., Gray, B.H., Haseman, J.R., Mayo, K.H., Dunn, D.L. (1995). Peptide derivatives of three distinct lipopolysaccharide binding proteins inhibit LPS-induced tumor necrosis factor- α secretion in vitro. *Surgery* 118:318-24.
7. Dahlberg, P.S., Acton, R.D., Battafarano, R.J., Uknis, M.E., Ratz, C.A., Johnston, J.W., Haseman, J.R., Gray, B.H., Dunn, D.L. (1996). A novel endotoxin antagonist attenuates tumor necrosis factor- α secretion. *J. Surg. Res.* 63:44-48
8. Uknis, M.E., Wasiluk, K.R., Acton, R.D., Klaerner, H.G., Dahlberg, P.S., Ilyina, E.E., Haseman, J.R., Gray, B.H., Mayo, K.H., Dunn, D.L. (1997). Design of a potent novel endotoxin antagonist. *Surgery* 122:380-5
9. Ried, C., Wahl, C., Miethke, T., Wellenhofer, G., Landgraf, C., Scheneider-Mergener, J., Hoess, A. (1996). High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant *Limulus* anti-LPS factor. *J. Biol. Chem.* 271(45):28120-127.
10. Han, J., Ulevitch, R., Tobias, P. (1995). Polypeptides of lipopolysaccharide binding protein. WO 95/25117.

11. Heavner, G.A., Taylor, A., Sgerris, D. (1994). Novel peptides useful for inhibiting binding of LPS by LPS-binding protein. WO 95/08560.
12. Gazzano-Santoro, H., Theofan, G., Trown, P.W. (1995). Lipopolysaccharide binding protein derivatives. WO 95/00641.
13. Hoess, A., Liddington, R.C. (1995). Lipopolysaccharide-binding and neutralizing peptides. WO 95/05393.
14. Araña, M.J., Chinea, G., Guerra, M. y Rodríguez, A. Péptidos derivados de la proteína que enlaza LPS, que neutralizan la activación celular mediada por LPS y mejoran las afecciones relacionadas con la endotoxina (1997). OCPI 128/97
15. Hoess, A., Watson, S., Siber, G.R., Liddington, R. (1993). Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from horseshoe crab, *Limulus* anti-LPS factor, at 1.5Å resolution. *EMBO J.* 12(9):3351-56.
16. Lamping, N., Hoess, A., Yu, B., Park, T.C., Kirschning, C.J., Pfeil, D., Reuter, D., Wright, S.D., Herrmann, F., Schumann, R.R. (1996). Effects of site-directed mutagenesis of basic residues (Arg94, Lys95, Lys99) of LPS-binding protein on binding and transfer of LPS and subsequent immune cell activation. *J. Immunol.* 157:4648-56
17. Merrifield, R. B. (1963) *J. Amer. Chem. Soc.* 1963, 85:2149-2154